

COMPARACIÓN DEL EFECTO DE MEDIOS CONDICIONADOS DE CULTIVOS DE 2 TIPOS DE CÉLULAS  
MADRE MESENQUIMALES SOBRE LA CICATRIZACIÓN DE HERIDAS EN RATONES

RAFAEL EDUARDO SÁNCHEZ CUERVO

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA  
FACULTAD DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FISIOLÓGICAS  
MAESTRÍA EN FISIOLÓGÍA  
SANTAFÉ DE BOGOTÁ  
2011

**COMPARACIÓN DEL EFECTO DE MEDIOS CONDICIONADOS DE CULTIVOS DE 2 TIPOS DE CÉLULAS  
MADRE MESENQUIMALES SOBRE LA CICATRIZACIÓN DE HERIDAS EN RATONES**

**RAFAEL EDUARDO SÁNCHEZ CUERVO, Lic. B y Q, Esp.**  
Código 597858

Trabajo de Tesis de Grado presentado como requisito parcial para optar al título de  
**MAGISTER EN FISIOLÓGIA**

**ORLANDO CHAPARRO GARZÓN, Ph.D.**  
**Profesor Asociado**  
Director de Tesis

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA  
FACULTAD DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FISIOLÓGICAS  
MAESTRÍA EN FISIOLÓGIA  
SANTAFÉ DE BOGOTÁ  
2011

COMPARACIÓN DEL EFECTO DE MEDIOS CONDICIONADOS DE CULTIVOS DE 2 TIPOS DE CÉLULAS  
MADRE MESENQUIMALES SOBRE LA CICATRIZACIÓN DE HERIDAS EN RATONES

NOTA DE ACEPTACIÓN

---

---

---

---

PRESIDENTE DEL JURADO

---

JURADO

---

JURADO

---

DIRECTOR DE TESIS

BOGOTÁ, \_\_\_\_\_ de 2011

## TÍTULO

COMPARACIÓN DEL EFECTO DE MEDIOS CONDICIONADOS DE CULTIVOS DE 2 TIPOS DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES SOBRE LA CICATRIZACIÓN DE HERIDAS EN RATONES

## TITLE

COMPARISON OF THE EFFECT OF CONDITIONED MEDIA OF 2 TYPES OF MESENCHYMAL STEM CELLS ON WOUND HEALING IN MICE

## RESUMEN

El tratamiento de heridas que presentan alteraciones en su proceso de curación y se vuelven crónicas pueden tener un alto impacto tanto económico como social y generar en los pacientes consecuencias negativas en diferentes ámbitos así como sensaciones de pesimismo, incluso para el personal que lo atiende.

Mejorar las opciones de tratamientos para acelerar la curación de heridas ha sido una inquietud del cuerpo médico. Una de las alternativas terapéuticas con mayor futuro en este campo es la terapia celular empleando células madre mesenquimales (MSC), que pueden secretar factores de crecimiento (FC) que estimulan el cierre de la herida, la angiogénesis, disminuyen la apoptosis y la inflamación a través de mecanismos paracrinós, y se pueden encontrar en muchos tejidos, principalmente en la médula ósea (BMMSC) y tejido adiposo (ADMSC). Estos FC pueden pasar a los medios de cultivo y convertirse en medios condicionados (MC), los cuales tienen un efecto similar a las MSC.

Este trabajo de investigación tiene como objetivo evaluar y comparar MC de BMMSC y de ADMSC humanas, obtenidos en condiciones de hipoxia y de normoxia, en el proceso de cicatrización de heridas en ratones para determinar su efecto en el cierre de la herida y los cambios histológicos más notorios que se puedan presentar con miras a futuras aplicaciones en pacientes con heridas de difícil cicatrización.

## ABSTRACT

Treatment of wounds that involve alterations in the process of healing and become chronic can generate a high economic and social impact and negative consequences in patients, including pessimistic sensations, that can affect even the personnel who takes care of them.

Health workers have been wondering how to improve the treatments in order to accelerate wounds healing. One of the therapeutic alternatives with greater future in this field is cellular therapy using mesenchymal stem cells (MSC), which stimulate wound repair, angiogenesis, and diminishes apoptosis and inflammation through paracrine mechanisms. It is possible to find MSC in many tissues, mainly in the bone marrow (BMMSC) and adipose tissue (ADMSC). Growth factors, that can accelerate the treatment of wounds, can be secreted to culture medium and the conditioned medium (CM), may have a similar effect to MSC.

The goal of this research was to evaluate and compare CM of human BMMSC and ADMSC, obtained in hypoxia and normoxia, during the process of wound healing in mice, determining their effect in wound repair and to evaluate histological changes during the process. Hopefully these results could be useful in the near future for patients with chronic wounds.

## PALABRAS CLAVES

Medios condicionados; células madre mesenquimales, heridas, médula ósea, tejido adiposo

## KEY WORDS

Conditioned media; mesenchymal stem cells, wounds, bone marrow, adipose tissue

## COMPARACIÓN DEL EFECTO DE MEDIOS CONDICIONADOS DE CULTIVOS DE 2 TIPOS DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES SOBRE LA CICATRIZACIÓN DE HERIDAS EN RATONES

### RESUMEN

El tratamiento de heridas que presentan alteraciones en su proceso de curación y se vuelven crónicas pueden tener un alto impacto tanto económico como social y generar en los pacientes consecuencias negativas en diferentes ámbitos así como sensaciones de pesimismo, incluso para el personal que lo atiende.

Mejorar las opciones de tratamientos para acelerar la curación de heridas ha sido una inquietud del cuerpo médico. Una de las alternativas terapéuticas con mayor futuro en este campo es la terapia celular empleando células madre mesenquimales (MSC), que pueden secretar factores de crecimiento (FC) que estimulan el cierre de la herida, la angiogénesis, disminuyen la apoptosis y la inflamación a través de mecanismos paracrinós, y se pueden encontrar en muchos tejidos, principalmente en la médula ósea (BMSC) y tejido adiposo (ADMSC). Estos FC pueden pasar a los medios de cultivo y convertirse en medios condicionados (MC), los cuales tienen un efecto similar a las MSC.

Este trabajo de investigación tiene como objetivo evaluar y comparar MC de BMSC y de ADMSC humanas, obtenidos en condiciones de hipoxia y de normoxia, en el proceso de cicatrización de heridas en ratones para determinar su efecto en el cierre de la herida y los cambios histológicos más notorios que se puedan presentar con miras a futuras aplicaciones en pacientes con heridas de difícil cicatrización.

## COMPARISON OF THE EFFECT OF CONDITIONED MEDIA OF 2 TYPES OF MESENCHYMAL STEM CELLS ON WOUND HEALING IN MICE

### ABSTRACT

Treatment of wounds that involve alterations in the process of healing and become chronic can generate a high economic and social impact and negative consequences in patients, including pessimistic sensations, that can affect even the personnel who takes care of them.

Health workers have been wondering how to improve the treatments in order to accelerate wounds healing. One of the therapeutic alternatives with greater future in this field is cellular therapy using mesenchymal stem cells (MSC), which stimulate wound repair, angiogenesis, and diminishes apoptosis and inflammation through paracrine mechanisms. It is possible to find MSC in many tissues, mainly in the bone marrow (BMMSC) and adipose tissue (ADMSC). Growth factors, that can accelerate the treatment of wounds, can be secreted to culture medium and the conditioned medium (CM), may have a similar effect to MSC.

The goal of this research was to evaluate and compare CM of human BMMSC and ADMSC, obtained in hypoxia and normoxia, during the process of wound healing in mice, determining their effect in wound repair and to evaluate histological changes during the process. Hopefully these results could be useful in the near future for patients with chronic wounds.

DEDICO ESTE TRABAJO A:

A DIOS, QUIEN PERMITIÓ FINALMENTE ESTE LOGRO

A MIS PADRES, OLGA Y RAFAEL, QUIENES HICIERON POSIBLE  
ESTE SUEÑO CON SU APOYO Y AMOR.  
NO SE IMAGINAN CUANTO LOS AMO

A MIS HERMANOS ANA MARÍA Y FABIÁN POR APOYARME Y  
ESTAR PENDIENTES DE MI Y MIS HIJAS. LOS AMO MUCHO

A MIS HIJAS GRECIA VALERIA (POLLO) Y CRISTHAL SILVANNA (TATAL),  
A QUIENES LES ROBÉ TIEMPO DE SU INFANCIA Y SU COMPAÑÍA  
Y FUERON MI MOTOR PARA CULMINAR MIS ESTUDIOS.  
USTEDES SON MI ALMA Y MI RAZÓN DE SER Y VIVIR  
LAS AMO CON EL CORAZÓN

A SOFÍA, POR ACOMPAÑARME ESTE TIEMPO Y APOYARME  
EN TODO MOMENTO, BUENOS Y MALOS, Y DARME SU AMOR.  
TE AMO

A TODOS Y CADA UNO DE LOS INTEGRANTES DE LAS FAMILIAS SÁNCHEZ  
Y CUERVO POR SU AMOR Y APOYO DURANTE MI VIDA Y MIS ESTUDIOS

LOS AMO A TODOS.

¡GRACIAS POR TODO!

## AGRADECIMIENTOS

Al Doctor Orlando Chaparro Garzón, Ph.D., por su orientación y guía durante este proceso.

A los docentes de la Unidad de Fisiología, especialmente al profesor Miguel Martínez, por sus enseñanzas, amistad y consejos y mostrarme que existen otras formas de desempeño docente; a la Doctora Zulma Dueñas, Ph. D., por su amistad, apoyo y guía durante mi estadía en esta universidad y en la Maestría.

Al profesor Manuel Rojas y a Rodrigo, laboratorista de Fisiología de MVZ, por el préstamo del laboratorio para la anestesia de los ratones de las pruebas piloto.

A los doctores Ángel Yobani Sánchez M y Carlos Arturo Clavijo R. por la evaluación del texto y sus importantes sugerencias para mejorar el mismo; a la Doctora Lucía Botero y al Doctor Giovanni Torres por la colaboración en el análisis histopatológico.

A las profesoras de la Facultad de Enfermería, especialmente a las profesoras Fanny Rincón, Elizabeth Vargas, Martha Bejarano, Magda Solano y Martha Triana por su colaboración y consejos durante mi desempeño como docente de esta Facultad.

A Mary, nuestra secretaria de toda la maestría y quien siempre tuvo la respuesta indicada a nuestros trámites y preguntas a la cual le adicionaba una gran sonrisa.

A Alba Rocío González por su amistad, colaboración y gentileza durante la realización de las pruebas pilotos ya que sin su ayuda estas pruebas hubieran sido un desastre; Arturo Cortés y el personal del bioterio de MVZ durante la realización de las pruebas experimentales por el cuidado de mis ratones y lo que aprendí con ellos.

A Luz Mery Tovar, Natalia, Laura, Juliana y Lupe, por su amistad, hospitalidad y paciencia conmigo y mi familia en momentos difíciles. Gratitud perenne.

A las secretarías de la Facultad de Enfermería, especialmente a las Marthicas, Nubiecita, Marly (aunque ya no trabaje en la U), Pao, Sandra, Blanquita, Estelita, Glenis y Eunice (así haya pasado a Medicina) por su amistad, confianza, colaboración, diligencia y paciencia conmigo como profesor de la facultad; al personal de Audiovisuales y el Centro de Informática de la Facultad de Enfermería especialmente a Rosalbita, Libardo, Pedrito y Joaquín por su colaboración y paciencia con mis solicitudes de equipos.

A Adriana Gutiérrez y Atticus Pinzón por compartir todo el tiempo en la maestría; Adriana Doncel, Itali Linero y Diana Núñez mis compañeras de grupo de investigación; mis compañeros de maestría Iván Álvarez, de quien aprendí el manejo de los ratones, Leonardo, las Paolas, Ana María Perdomo, Jeremy, Diego y todos aquellos con los que compartí este tiempo

A Jerry y Bigotes y todos los ratones que con sus vidas hicieron posible esta investigación. ¡Gracias muchachos por el sacrificio!

A todas y cada una de las personas que de alguna forma me colaboraron y aportaron en este tiempo de aprendizaje y convivencia en Bogotá.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>11</b>
<b>LISTA DE TABLAS .....</b>	<b>12</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>13</b>
<b>1. MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>14</b>
1.1 FISIOLÓGÍA DEL PROCESO DE CURACIÓN DE HERIDAS .....	14
1.2 FISIOPATOLOGÍA DEL PROCESO DE CURACIÓN DE HERIDAS .....	16
1.3 TRATAMIENTOS PARA CURACIÓN DE HERIDAS.....	18
1.4. CÉLULAS MADRE.....	19
1.4.1. ¿Qué son las células madre y por qué se caracterizan? .....	19
1.4.2. Clases de Células Madre. ....	20
1.5. CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES (MSC).....	20
1.5.1. Definición de células madre mesenquimales (MSC) .....	20
1.5.2. Características y fuentes de las MSC. ....	20
1.5.3. Efectos de hipoxia y normoxia en MSC.....	21
1.5.4. Señalización paracrina de las MSC.....	21
1.5.5. Efectos terapéuticos de las MSC.....	22
1.5.6. Modelos animales y ensayos clínicos con MSC.....	23
1.5.7. Posibles efectos colaterales del tratamiento con MSC. ....	24
1.6. MEDIOS CONDICIONADOS (MC).....	25
1.6.1. Concepto de Medios Condicionados (MC). ....	25
1.6.2. Condicionamiento y obtención de MC.....	26
1.6.3. Usos y formas de empleo de los MC.....	26
1.6.4. MC de MSC. ....	26
<b>2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>	<b>30</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>32</b>
3.1. OBJETIVO GENERAL .....	32
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	32
<b>4. HIPÓTESIS .....</b>	<b>33</b>
4.1. HIPÓTESIS NULA .....	33

<b>4.2. HIPÓTESIS ALTERNA.....</b>	<b>33</b>
<b>5. METODOLOGÍA .....</b>	<b>34</b>
<b>5.1 FLUJOGRAMA DE LA METODOLOGÍA.....</b>	<b>34</b>
<b>5.2 OBTENCIÓN DE LOS MEDIOS CONDICIONADOS .....</b>	<b>34</b>
<b>5.3. TRABAJO CON ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.....</b>	<b>34</b>
<b>5.4. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS.....</b>	<b>35</b>
<b>5.5. ANÁLISIS DE LAS HERIDAS.....</b>	<b>35</b>
5.5.1. Cierre de la herida. ....	35
5.5.2. Análisis histopatológico. ....	36
<b>5.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....</b>	<b>36</b>
<b>6. RESULTADOS .....</b>	<b>37</b>
<b>6.1. CIERRE DE LA HERIDA .....</b>	<b>37</b>
<b>6.2. ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO .....</b>	<b>45</b>
<b>7. DISCUSIÓN .....</b>	<b>60</b>
<b>7.1. CIERRE DE LA HERIDA .....</b>	<b>60</b>
<b>7.2. ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO .....</b>	<b>61</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>63</b>
<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>64</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>65</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>76</b>

## LISTA DE FIGURAS

Fig. 1. Fases de la curación de heridas. ....	14
Fig. 2. Fases de la angiogénesis.....	16
Fig. 3. Diferencias en la curación de la herida normal y la herida aguda.....	17
Fig. 4. Flujograma de la metodología.....	34
Fig. 5. Localización de las heridas.....	35
Fig. 6. Cierre de las heridas con MC de MO.....	37
Fig. 7. Contracción de las heridas con MC de MO.....	38
Fig. 8. Evolución del cierre de las heridas con MC de MO.....	38
Fig. 9. Cierre de las heridas con MC de Ad.....	40
Fig. 10. Contracción de las heridas con MC de Ad.....	40
Fig. 11. Evolución cierre de las heridas con MC de Ad.....	41
Fig. 12. Cierre de las heridas con MC de MO-H y Ad-H.....	42
Fig. 13. Contracción de las heridas con MC de Ad-H y MO-H.....	43
Fig. 14. Evolución Cierre de las heridas con MC de Ad-H y MO-H.....	43
Fig. 15. Imágenes histológicas de las heridas tratadas con MC de Ad-H.....	47
Fig. 16. Imágenes histológicas de las heridas tratadas con MC de Ad-N.....	48
Fig. 17. Score histológico de las heridas con MC de Ad.....	48
Fig. 18. Angiogénesis empleando MC de Ad al día 7.....	49
Fig. 19. Angiogénesis empleando MC de Ad al día 14.....	49
Fig. 20. Densidad capilar empleando MC de Ad.....	50
Fig. 21. Imágenes histológicas de las heridas tratadas con MC de MO-H.....	52
Fig. 22. Imágenes histológicas de las heridas tratadas con MC de MO-N.....	53
Fig. 23. Score histológico de las heridas con MC de MO.....	53
Fig. 24. Angiogénesis empleando MC de MO al día 7.....	54
Fig. 25. Angiogénesis empleando MC de MO al día 14.....	54
Fig. 26. Densidad capilar empleando MC de MO.....	55
Fig. 27. Imágenes histológicas de las heridas tratadas con MC de Ad-H y MO-H.....	57
Fig. 28. Score histológico de las heridas con MC de MO-H y Ad-H.....	58
Fig. 29. Angiogénesis empleando MC de Ad-H y MO-H al día 7.....	58
Fig. 30. Angiogénesis empleando MC de Ad-H y MO-H al día 14.....	59
Fig. 31. Densidad capilar empleando MC de Ad-H y MO-H.....	59

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Características de las heridas agudas y crónicas .....	16
Tabla 2. Principales técnicas y tratamientos actuales para heridas reportados en la literatura .....	18
Tabla 3. Trabajos con modelos animales empleando MSC .....	23
Tabla 4. Ensayos clínicos donde se emplearon MSC como opción terapéutica .....	24
Tabla 5. Principales FC secretados por MSC y que son reportados en diferentes artículos .....	27
Tabla 6. Trabajos donde se emplean MC como opción terapéutica en diversas patologías .....	27
Tabla 7. Puntuación de cambios histológicos en la curación de heridas .....	36
Tabla 8. Resultados de los ANOVAS para la prueba 1: MC de MOH vs MON .....	37
Tabla 9. Resultados de los ANOVAS para la prueba 2: MC de Ad-H vs Ad-N .....	39
Tabla 10. Resultados de los ANOVAS para la prueba 3: MC de Ad-H vs MO-H .....	42
Tabla 11. Cambios en la reepitelización y el tejido de granulación observados el día 7 p.h. con los MC de Ad .....	45
Tabla 12. Cambios en el número de células inflamatorias y vasos sanguíneos el día 7 p.h. con los MC de Ad .....	46
Tabla 13. Cambios en la reepitelización y el tejido de granulación observados el día 14 p.h. con los MC de Ad. ....	46
Tabla 14. Cambios en el número de células inflamatorias y vasos sanguíneos el día 14 p.h. con los MC de Ad. ....	47
Tabla 15. Cambios en la reepitelización y el tejido de granulación observados el día 7 p.h. con los MC de MO .....	50
Tabla 16. Cambios en el número de células inflamatorias y vasos sanguíneos el día 7 p.h. con los MC de MO .....	51
Tabla 17. Cambios en la reepitelización y el tejido de granulación observados el día 14 p.h. con los MC de MO .....	51
Tabla 18. Cambios en el número de células inflamatorias y vasos sanguíneos el día 14 p.h. con los MC de MO .....	52
Tabla 19. Cambios en la reepitelización y el tejido de granulación observados el día 7 p.h. con los MC de Ad-H y MO-H .....	55
Tabla 20. Cambios en el número de células inflamatorias y vasos sanguíneos el día 7 p.h. con los MC de Ad-H y MO-H .....	56
Tabla 21. Cambios en la reepitelización y el tejido de granulación observados el día 14 p.h. con los MC de Ad-H y MO-H .....	56
Tabla 22. Cambios en el número de células inflamatorias y vasos sanguíneos el día 14 p.h. con los MC de Ad-H y MO-H .....	57

## INTRODUCCIÓN

En medicina el proceso de curación de heridas en pacientes que han sufrido diversas patologías, ha tenido grandes avances en los últimos años. Se ha pasado de los simples tratamientos donde sólo se lavaba, se desinfectaba y se cubría nuevamente la herida a procedimientos de última generación como cubrirlas con injertos de piel tanto autólogo como alogénico, láminas de queratinocitos cultivados del mismo paciente o de donantes hasta constructos de piel sintética y la misma ingeniería de tejidos y la terapia celular.

Todos estos nuevos tratamientos tienen ventajas que los hacen ser una buena elección por parte del personal médico pero no dejan de tener algunos inconvenientes y desventajas que pueden impedir su uso y aplicación exitosa como lo es el rechazo inmunológico por parte del receptor, la dificultad técnica de obtener algunas de dichas coberturas, las implicaciones ético-religiosas del uso de tejidos de cadáveres o de animales o los grandes costos económicos que implica la tecnología para obtener estos nuevos métodos de curación.

En este orden de ideas, la terapia celular aparece en este escenario como una de las mejores opciones de tratamiento, especialmente con el empleo de MC de células madre mesenquimales (MSC), tanto las de médula ósea (BMMSC) como las de tejido adiposo (ADMSC). Existen trabajos, empleando diferentes modelos animales y algunos ensayos clínicos, que muestran prometedores resultados y que sugieren que los MC pueden ser empleados como opción terapéutica en diversas patologías para las cuales otros tratamientos no han sido efectivos o han tenido efectos secundarios no deseados de diversa índole.

Este proyecto pretende comparar estos MC en un modelo murino para comprobar el efecto de estos en el proceso de cicatrización de heridas de piel con la posibilidad de aplicar dichos hallazgos, posteriormente, en pacientes con heridas crónicas de difícil curación.

# 1. MARCO TEÓRICO

## 1.1 FISIOLÓGÍA DEL PROCESO DE CURACIÓN DE HERIDAS

La piel funciona como una barrera física para evitar numerosos daños y tiene un papel primordial para el mantenimiento de la homeostasis. Cuando se presentan heridas que comprometen su estructura, empieza una serie de reacciones altamente ordenada de eventos biológicos, celulares y químicos que restauran la homeostasis alterada. La eficiencia y el proceso completo de la curación de la herida son factores críticos para el bienestar de cualquier paciente (Hom, 1999; Falanga, 2005; Kapoor M. et al, 2006).

Estos procesos dinámicos han sido determinados en modelos animales y no pueden ser separados claramente ya que dichos eventos se agrupan en cuatro fases que se sobrelapan entre sí: coagulación, inflamación, migración-proliferación y remodelación (Falanga, 2005; Enoch S et al, 2005) (Fig. 1):

Fases de la curación de heridas

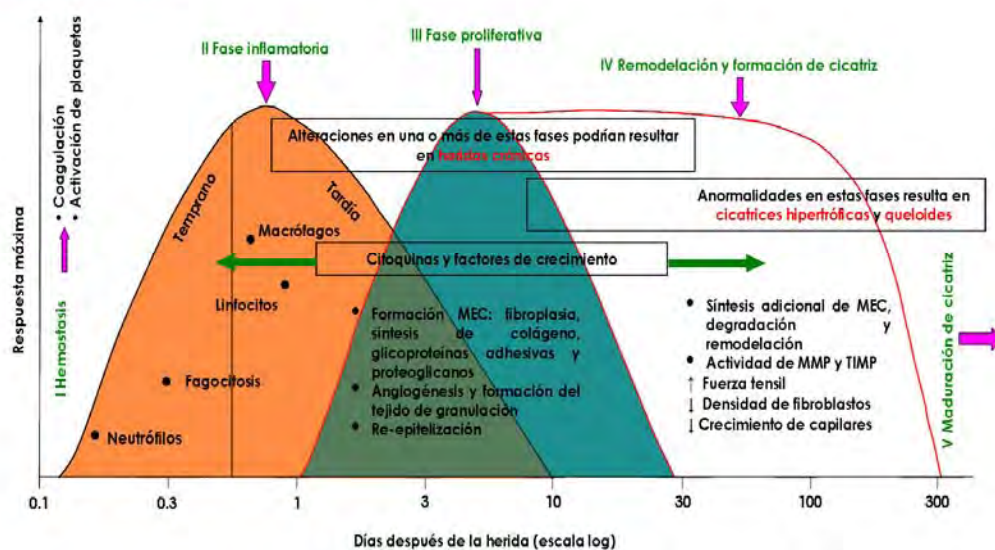


Fig. 1. Fases de la curación de heridas. Modificado de Enoch, Stuart; Leaper, David John. Basic science of wound healing. Surgery 23: 2, 2005 The Medicine Publishing Company Ltd. MEC: Matriz extracelular; MMP: Metaloproteinasas; TIMP: Inhibidores tisulares de metaloproteinasas.

Las fases de curación de una herida son las siguientes:

**Fases 1 y 2: Coagulación o hemostasis e inflamación:** Es la primera reacción de la piel después de la lesión para evitar la pérdida de fluidos, detener agentes patógenos y proveer una cobertura temporal a la herida. Este cierre temporal se da por vasoconstricción y por acumulación de plaquetas que forman un tapón que se encuentran en una malla de fibrina, fibronectina, vitronectina y tromboespondina (Singer AJ, 1999 en Falanga, 2005; Kapoor M. et al, 2006).

En este tapón, las plaquetas se activan y secretan FC importantes en el reclutamiento de neutrófilos y macrófagos así como en la formación tardía de la matriz extracelular (MEC). Los neutrófilos y los monocitos, que se convierten en macrófagos, participan en la debridación de la herida y producen FC claves para mantener el proceso de reparación como CTGF (factor de crecimiento de tejido conectivo), PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas), VEGF (factor de crecimiento vascular endotelial), EGF (factor de crecimiento epidermal), etc. (ver tabla 5) (Martin P, 2004 en Falanga, 2005; Kapoor M. et al, 2006).

Inmediatamente se presenta el daño, la herida se encuentra hipóxica, situación que prepara para la migración de queratinocitos, angiogénesis temprana, proliferación y expansión de fibroblastos y la transcripción y síntesis de FC y citoquinas trascendentales como PDGF, VEGF y TGF- $\beta$  1 (factor de crecimiento transformante beta 1) (Falanga, 2004 en Falanga 2005; Kapoor M. et al, 2006).

**Fases 3 y 4: Proliferación - migración y remodelamiento:** La fase de proliferación va del 5º hasta el día 14 e involucra la reparación de las capas de la piel. En los 2-3 días siguientes a la herida, los fibroblastos, macrófagos y tejido vascular forman el tejido de granulación, que incluye miofibroblastos (Mehendale FMP, 2001 en Falanga 2005; Kapoor M. et al, 2006; Rhett JM, et al, 2008).

Gracias a la nueva MEC, el tejido de granulación y la aparición de miofibroblastos, se produce una contracción rápida de la herida. La contracción puede verse afectada por infecciones o por desbalance en el remodelamiento de la MEC. Las proteínas de la MEC (colágeno, fibronectina y vitronectina) suministran una base para la migración celular al modificar el comportamiento celular y devuelven la integridad y la función al tejido lesionado (Falanga, 2002 en Falanga, 2005).

La migración de los queratinocitos es imprescindible en la curación de la herida para formar nueva epidermis; los fibroblastos y las células endoteliales son reclutadas para formar el tejido de granulación, al tiempo que las metaloproteinasas de la matriz (MMPs) y proteasas séricas degradan la matriz y regulan la migración celular (Singer AJ, 1999; Toy LW, 2005 en Falanga 2005; Rhett JM et al, 2008).

La angiogénesis es fundamental en la curación de la herida. Comienza con la degradación de la membrana basal de los vasos parentales, permitiendo la formación de un "brote capilar" (Kapoor M. et al, 2006). (Fig. 2) Los brotes de capilares invaden el tapón y organizan una red microvascular en el tejido de granulación. Al acumularse colágeno en el tejido de granulación, la densidad de vasos sanguíneos disminuye progresivamente y la perturbación de este proceso puede desarrollar heridas crónicas (Enoch S, 2005).

Luego de migrar los queratinocitos, la herida entra en fase de maduración y continúa la remodelación del tejido de granulación (Rhett JM et al, 2008). Esta fase requiere un balance entre síntesis y degradación del colágeno. Las MMPs rompen el colágeno sintetizado y el equilibrio se alcanza luego de tres semanas (Williamson D, 2004).

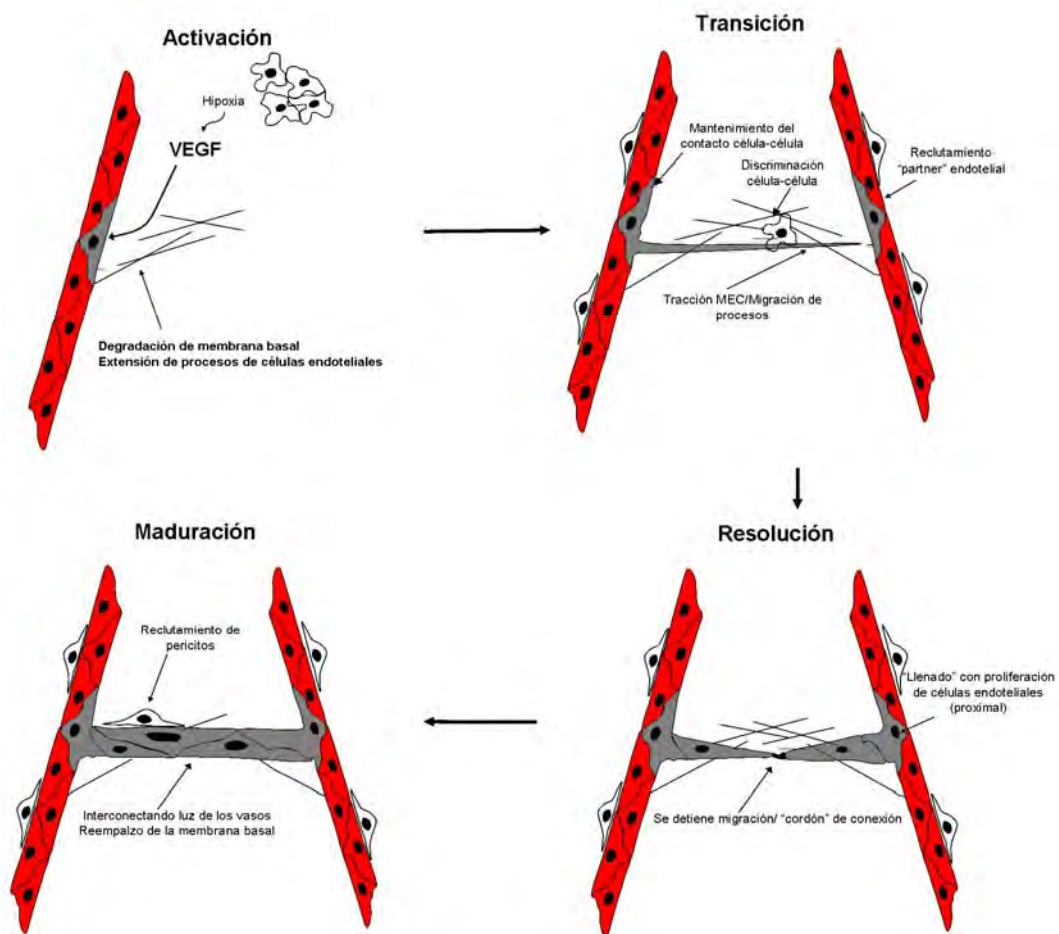


Fig. 2. Fases de la angiogénesis. Modificado de Daniel, Thomas; Abrahamson, Dale. Endothelial signal integration in vascular assembly. Annu. Rev. Physiol. 2000. 62:649-71.

## 1.2 FISIOPATOLOGÍA DEL PROCESO DE CURACIÓN DE HERIDAS

Al trastornarse una o más fases de la curación, el efecto es la alteración de este proceso que puede empeorar si existen patologías que impidan, bloqueen o alteren el normal funcionamiento celular. De acuerdo con lo anterior, las heridas se pueden clasificar en agudas y crónicas y sus principales características se describen en la Tabla 1 y la Fig. 3 (Falanga, 2005):

Tabla 1. Características de las heridas agudas y crónicas

HERIDAS AGUDAS	HERIDAS CRÓNICAS
<ul style="list-style-type: none"> <li>No se presentan defectos patofisiológicos.</li> <li>Su curación es rápida.</li> <li>Menor gasto energético para curar.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Presentan anomalías fisiopatológicas.</li> <li>Curación lenta.</li> <li>Alto consumo energético en proceso de curación.</li> </ul>

- Siguen en orden las fases de curación (fig. 1).
- Niveles normales de citoquinas, MMPs y actividad celular.
- Flujo normal de neutrófilos.
- Abundan los FC y su degradación es baja.
- No siguen el orden de las fases de curación.
- Presentan niveles incrementados de citoquinas, MMPs y actividad celular (Bjarnsholt T et al, 2008).
- Presentan flujo continuo de neutrófilos que liberan enzimas citotóxicas que pueden causar daño en el tejido hospedero (Bjarnsholt T et al, 2008).
- Los FC disminuidos y su degradación es alta. (Falanga, 2005).

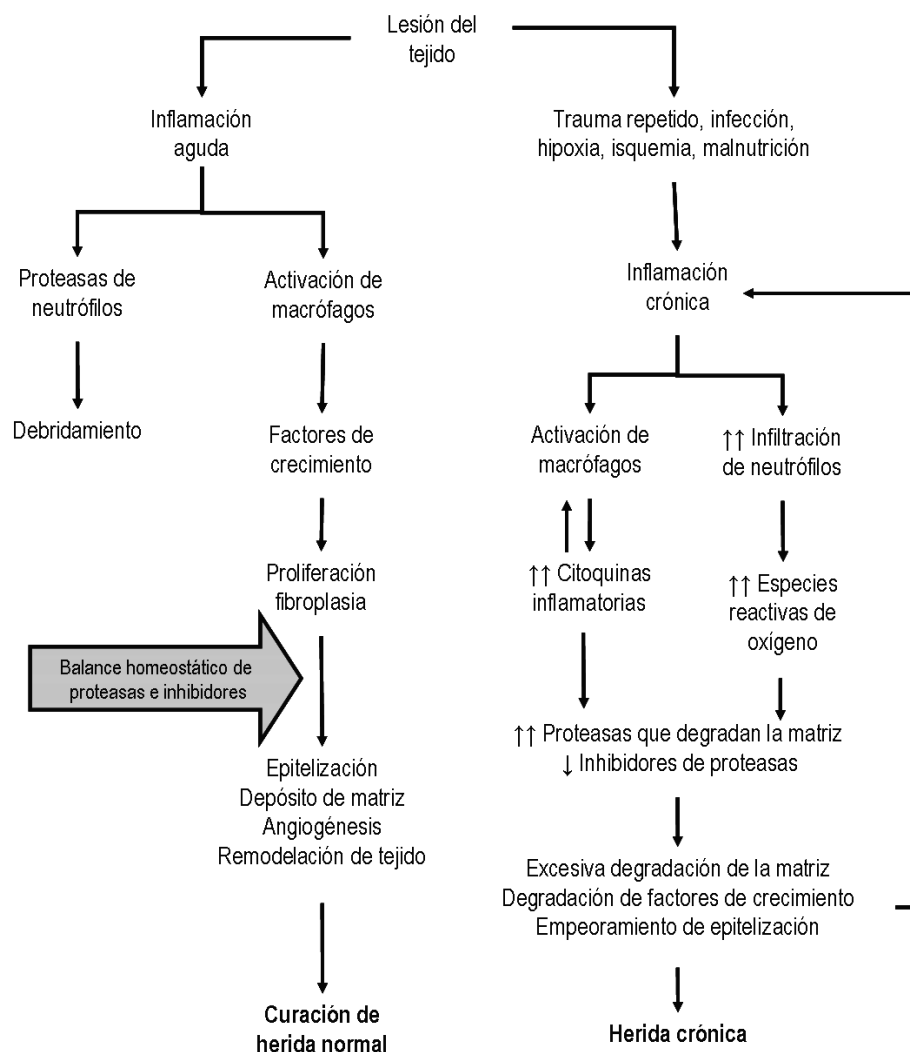


Fig. 3. Diferencias en la curación de la herida normal y la herida aguda. Modificado de Hom, David B. Contemporary concepts and progress in wound healing [Head And Neck Reconstruction]. 1999 Lippincott Williams & Wilkins, Inc. Volume 7(4) August 1999 p 193.

Las heridas crónicas, de acuerdo con las características patogénicas mencionadas antes, se pueden agrupar en varias categorías cuyos tratamientos varían de acuerdo a dichas particularidades:

- Úlceras venosas de las piernas, producidas por el malfuncionamiento de las válvulas venosas que originan un aumento en la presión capilar y edema que desarrolla la úlcera, cuyo tratamiento frecuente es la compresión de la misma.
- Úlceras de pie diabético originadas por sobrecarga repetida en el pie isquémico, y el procedimiento de elección para estas úlceras es reducir la sobrecarga y mejorar la circulación en la extremidad.
- Úlceras por presión son otro grupo de patologías causadas por un exceso de carga en diferentes áreas vulnerables de un paciente inmovilizado y cuya mejoría se logra con colchones y sillas especiales y cambios frecuentes de posición (Lerman OZ et al, 2003 en Bjarnsholt T et al, 2008).

En algunas ocasiones, a pesar del tratamiento y las indicaciones correctas, algunas de estas heridas no sanan o lo hacen de forma muy lenta a causa de disfunciones de los fibroblastos, defectos del sistema inmune, cáncer, mala nutrición, obesidad, uso de sustancias alucinógenas, alcoholismo y tabaquismo, lo que frena el proceso de curación de la herida y pueden deteriorarla (Bjarnsholt T et al, 2008).

En las heridas crónicas, el proceso de contracción, en ocasiones, produce contractura de la cicatriz debido a miofibroblastos que no son inducidos a apoptosis y la producción de MEC por parte de los fibro y miofibroblastos que originan rigidez en la cicatriz, sumado a las fuerzas ejercidas por los miofibroblastos que contribuyen a formar cicatrices hipertróficas. (Enoch S, 2005).

### **1.3 TRATAMIENTOS PARA CURACIÓN DE HERIDAS.**

Por lo anteriormente expuesto, ha sido una preocupación del cuerpo médico y científico, buscar nuevas formas de acelerar el proceso de curación y cicatrización de heridas, ya sea mejorando los diferentes tratamientos clínicos existentes (vendajes y limpieza de heridas, técnicas quirúrgicas, etc.) o innovando tecnologías de mayor complejidad (uso de membrana amniótica humana, injertos de piel autólogos, cultivo de keratinocitos, terapia celular, terapia génica, citoquinas, ingeniería de tejidos etc.) (Barroetabeña A et al, 2002; Atiyeh, B S et al, 2005; Akita, S., 2007).

De los avances y técnicas más importantes para el propósito de la curación de heridas vale la pena resaltar las siguientes, apreciando sus ventajas y desventajas (Tabla 2):

**Tabla 2. Principales técnicas y tratamientos actuales para heridas reportados en la literatura**

TRATAMIENTO	USOS	VENTAJAS	DESVENTAJAS
<b>MEMBRANA AMNIÓTICA</b> (Gajiwala K, 2004 en Atiyeh B.S. et al, 2005).	Tratamiento de quemaduras.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Preserva la cama de la herida.</li> <li>• Mantiene bajo conteo bacterial.</li> <li>• Reduce pérdida de proteínas, electrolitos y fluidos.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Difícil manipulación.</li> <li>• Riesgo de contaminación por virus.</li> </ul>
<b>INJERTO AUTÓLOGO</b>	Heridas extensas.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mejora cobertura de piel lesionada con piel sana y de calidad (Tanner JC et al, 1964 en Ruszczak Z, 2000).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Crecimiento de hojas epidermales lento y sensibles a infecciones.</li> <li>• Regeneración dérmica lenta y prolongada, piel débil y ampollada (Ruszczak Z, 2000).</li> </ul>

<b>CULTIVOS Y TRANSPLANTES DE QUERATINOCITOS</b> (Bannasch H et al, 2003 en Atiyeh B.S. et al, 2005).	Tratamiento de quemaduras severas de espesor total.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Evita incomodidad de recolección del injerto.</li> <li>• Gran área de superficie obtenida de una biopsia pequeña.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Retraso para proveer las hojas de queratinocitos.</li> <li>• Fragilidad, dificultad de manejo y costos altos (Braye F et al, 2000 en Atiyeh B.S. et al, 2005).</li> </ul>
<b>CITOQUINAS</b>	Heridas de quemaduras extensas.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Puede bloquear la activación inmediata de cascadas inflamatorias.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aplicación local poco efectiva por enzimas y proteasas de la herida.</li> <li>• Grandes cantidades para efectos terapéuticos.</li> <li>• Se necesita de exposición repetida o prolongada. (Eming SA et al, 1997 en Hom D, 1999).</li> </ul>
<b>INGENIERÍA DE TEJIDOS</b> (Muschler GF et al, 2004 en Arosarena O, 2005).	Conseguir sustitutos que mejoren, potencien o reemplacen órganos corporales.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Respuesta a excesiva demanda y poca oferta de órganos.</li> <li>• Transición de órganos de reemplazo con bioinjerto a órganos de reemplazo con células con una base de material durable.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Altos costos de producción.</li> </ul>

En los últimos años, la terapia celular emerge como terapia dirigida al reemplazo o reparación de tejidos dañados y presenta el mayor potencial de aplicación y de resultados positivos por su facilidad de aplicación (Kinnaird T et al, 2004 en Ocke P, 2005). Se destaca el hecho de empezar a tratar diferentes patologías, entre ellas heridas, empleando MSC extraídas, principalmente, de tejido adiposo (ADSCs) o de médula ósea (BMMSCs). (Badiavas E, 2003; McFarlin K et al, 2006; Bobis et al, 2006; Kim W-S et al, 2007). Estas células, al ser transplantadas, ejercen un efecto benéfico a través de FC con efectos angiogénicos y antiapoptóticos que limitan la extensión del daño y ayudan a restablecer el suministro sanguíneo (Fang BJ et al., 2004 en da Silva Meirelles et al, 2008).

## 1.4. CÉLULAS MADRE

**1.4.1. ¿Qué son las células madre y por qué se caracterizan?** Las células madre se pueden definir como un grupo de células indiferenciadas o inmaduras que poseen dos características principales: capacidad de autorrenovación y capacidad de diferenciación. La autorrenovación es asimétrica ya que una de las células conserva dicha capacidad y la otra entra a diferenciación en al menos, un tipo de células de un linaje especializado, incluso luego de un periodo de inactividad (Stocum D, 2001; Sadiq T.S., 2004; Beltrán O et al, 2005; Aeja H.M. et al, 2007; Cha J., 2007).

Además de las características anteriores, estas células tienen un enorme potencial de expansión; pueden diferenciarse a otros tipos celulares distintos a las células de los órganos en los que residen, capacidad conocida como plasticidad, y pueden permanecer "dormidas" o quiescentes en sus microambientes hasta que un estímulo adecuado las hace entrar nuevamente en sus ciclos vitales, situación que las protege de potenciales daños y las convierte en una terapia promisoriosa para el tratamiento de diferentes patologías (Vats A et al, 2002; Bongso A, 2004; Sadiq T, 2004; Yen C.C., 2006; Hatina J, 2008).

**1.4.2. Clases de Células Madre.** Las células madre se pueden clasificar de acuerdo con el grado de potencialidad y según su origen. Por el primer criterio, se clasifican en: 1) *Totipotentes*: células con la capacidad de originar un organismo y todos los tipos de células y tejidos que lo conforman, incluyendo tejido extraembrionario, situación que se presenta en el cigoto y los primeros 16 blastómeros resultantes del clivaje del cigoto; 2) *Pluripotentes*: células con la capacidad de diferenciarse a células que se derivan de las tres capas embrionarias como en el caso de las células madre embrionarias (ESC), excepto tejido extraembrionario y 3) *Multipotentes*: células con una capacidad de diferenciación limitada a células de un tejido determinado como las MSC (Vats A et al, 2002; Bongso A, 2004; Fortier L.A., 2005; Beltrán O et al, 2005; Aejaz H.M. et al, 2007).

Según su origen, se clasifican como 1) *Embrionarias* (ESC) que se derivan de las células de la masa interna del blastocisto y 2) *Adultas o somáticas* (ASC) células indiferenciadas que se hallan en tejidos maduros, como médula ósea, hígado, tejido adiposo, pulpa dental, sangre de cordón umbilical, etc., con capacidad de renovación constante como las células madre hematopoyéticas (HSC) y las MSC. Las ESC y ASC se diferencian entre sí por su localización, morfología, citología, receptores celulares de superficie y factores de transcripción (Vats A et al, 2002; Bongso A, 2004; Musina R.A. et al, 2004; Fortier L.A., 2005; Beltrán O et al, 2005; Aejaz H.M. et al, 2007).

## **1.5. CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES (MSC)**

**1.5.1. Definición de células madre mesenquimales (MSC).** Las MSC son una subpoblación de células indiferenciadas heterogéneas multipotentes no hematopoyéticas, de origen mesodérmico, que se pueden encontrar en la médula ósea y pueden diferenciarse a adipocitos, condrocitos y osteoblastos al ser nuevamente reintroducidas in vivo (Owen ME, 1988 en Zandstra P.W., 2001; Musina R.A et al, 2004).

**1.5.2. Características y fuentes de las MSC.** Las MSC se caracterizan por ser un tipo de célula con forma fibroblastoide que se pueden encontrar ampliamente distribuidas en el cuerpo en múltiples órganos a los cuales emplea como fuente para proliferar y luego diferenciarse en diferentes fenotipos de células mesenquimales (Gronthos S et al, 1995; Kusnetsov SA et al, 1997; Villaron EM et al, 2004 en Dazzi F et al, 2006; da Silva et al, 2008 en da Silva et al, 2009; Wagner J, 2009).

Además de estas características, el Comité de Células Madre Mesenquimales y Tisulares de la Sociedad Internacional para Terapia Celular (ISCT) estableció 3 criterios mínimos para definir las MSC: 1) ser adherentes al plástico en condiciones estándar de cultivo en laboratorio, 2) deben ser positivas en la expresión de marcadores de linaje como Stro-1, CD90, CD73, CD13 y CD105 y negativas para CD11b, CD19, CD45, CD34, CD14, CD79α y HLA-DR, aunque persiste la dificultad de encontrar los marcadores moleculares que permitan su identificación apropiada *in situ*, y 3) capacidad de diferenciarse en osteoblastos, adipocitos y condroblastos *in vitro* (da Silva Meirelles et al, 2008; Bianco P et al, 2001, Dominici M et al 2006 y Traktuev DO et al, 2008 en da Silva Meirelles et al, 2009; De Ugarte DA et al, 2003 en Sensebé L et al, 2010; Dominici M et al, 2006 en Hocking A y Gibran N, 2010).

Las MSC pueden estar presentes en la mayoría de los órganos como membrana sinovial, cordón umbilical, intestino, hígado, tejido adiposo, músculo estriado, pericitos, pulmón, pulpa dental, fluido amniótico y piel pero para propósitos terapéuticos son la sangre de cordón umbilical, el tejido adiposo y la médula ósea las fuentes más convenientes para aislarlas (Potten CS, 1990, Michalopoulos GK, 1997, Watt FM, 1998 en Zandstra P.W et al, 2001; Friedenstein AJ et al, 1974 en Guillot PV et al, 2007; Baksh D et al, 2004, Da Silva Meirelles L et al, 2006 en Chen Y et al, 2008).

En este orden de ideas, la médula ósea se constituye como el reservorio más confiable y rico en MSC aunque hay otras fuentes de fácil accesibilidad como el tejido adiposo ya que algunos estudios sugieren que las MSC aisladas de éste presentan también la capacidad de diferenciación a múltiples linajes, características biológicas similares a las MSC de médula ósea y propiedades inmunológicas que pueden suprimir la activación de células inmunes y participar en mecanismos de reparación a través de una variedad de mecanismos paracrinos (He Q et al, 2007 en Chen Y et al, 2008; Puissant B et al, 2005, Hoogdujin MJ et al 2007, Hematti P 2008 y Trivedi P and Hematti P 2008 en Hanson S et al, 2010).

**1.5.3. Efectos de hipoxia y normoxia en MSC.** El oxígeno, además de ser un importante sustrato metabólico para las funciones celulares, es una fuerte molécula de señalización para las células tanto in vivo como in vitro y que puede afectar diferentes características de las mismas. (Csete M, 2005; Lee EY et al, 2009; Abdollahi H et al, 2010).

Las células, incluyendo las MSC, en sus microambientes, soportan concentraciones de oxígeno, en promedio, inferiores al 4%, dependiendo de la localización, y las respuestas celulares ante la hipoxia varían según las condiciones de su microambiente. Esta situación contrasta con lo que sucede en el laboratorio, puesto que los cultivos celulares se mantienen con una concentración del 21%, lo que es subóptimo para las células madre, quienes incrementan su crecimiento y prolongan su pluripotencia al ser mantenidas en sus condiciones de concentración de oxígeno fisiológicas (Lennon DP et al, 2001, Grayson WL et al, 2007 en Lee EY et al, 2009; Csete M., 2005 y Ma Grayson F. et al, 2009 en Abdollahi H et al, 2010).

Ahora bien, si las MSC, tanto de médula ósea como de tejido adiposo, son cultivadas en condiciones de hipoxia, su tasa de proliferación y expansión mejora al simular el bajo ambiente de oxígeno en que viven a nivel tisular; además, la expresión de los FC proangiogénicos y antiapoptóticos aumenta en los medios de cultivos los que, al ser empleados en MC, disminuirán la extensión de muerte celular en los tejidos que rodean las áreas lesionadas, mejorando así la perfusión y reduciendo la necrosis (Lennon et al, 2001 en Csete M, 2005; Studer L et al, 2000, Rehman et al, 2004; Moon et al, 2006 en Beltrán, 2007; Grayson WL et al, 2007 en Abdollahi H et al, 2010).

**1.5.4. Señalización paracrina de las MSC.** Diferentes artículos reportan evidencias de que es la señalización paracrina el principal mecanismo responsable, y no la diferenciación en otros fenotipos celulares, de los efectos benéficos sobre otras células y el proceso de reparación de las heridas.

Estos mecanismos paracrinos, y los FC que secretan, son los responsables de la proliferación, reclutamiento y migración de queratinocitos epidérmicos, fibroblastos dérmicos y células endoteliales durante el proceso de curación de la herida, situación que permite un cierre más rápido de la herida, por lo que la señalización

paracrina tiene potenciales efectos benéficos sobre la angiogénesis, reepitelización y fibroproliferación durante el proceso de cicatrización (Kim W.S et al, 2007, Chen L et al, 2008 y Lee E.Y. et al, 2009 en Hocking AM, 2010).

**1.5.5. Efectos terapéuticos de las MSC.** En múltiples ensayos *in vivo* se ha demostrado que las células madre tienen una baja tasa de implantación y de diferenciación en tejidos lesionados y no contribuyen de manera significativa a la regeneración tisular. No obstante estos resultados, múltiples estudios han demostrado que las MSC pueden ser empleadas como efectivas herramientas terapéuticas gracias a los efectos paracrinos que pueden ejercer biomoléculas activas secretadas sobre otras células, así las MSC no injerten adecuadamente o no se diferencien, además de contar con la capacidad de establecerse en sitios lesionados, lo que aumenta las propiedades regenerativas de las MSC, incrementado la probabilidad de que las células o sus biomoléculas encuentren rápidamente los sitios donde se necesitan sus efectos paracrinos, lo que es de gran interés para aplicaciones clínicas (Caplan AI, et al, 2006 y Karp JM et al, 2009 en da Silva Meirelles et al, 2009).

Los efectos terapéuticos de las MSC se pueden agrupar en las siguientes categorías:

- Efectos tróficos: Este conjunto de efectos comprende:
  - Efectos antiapoptóticos: Autores como Togel et al (2007), encontraron, al analizar MC de MSC, FC como VEGF, HGF, factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1) y otros, los cuales se ha visto que mejoran la supervivencia y el crecimiento celular endotelial; similares resultados obtuvieron Parekkadan et al (2007) además que mostraron como las MSC reducen la mortalidad de ratas sometidas a falla hepática fulminante a 57% respecto al 86% del grupo control.
  - Efectos de crecimiento y diferenciación: Con la secreción de FC como SCF, LIF, IL-6, M-CSF por parte de MSC en experimentos *in vitro*, se ha observado la capacidad que tienen para soportar la hematopoyesis en estos estudios, además de ejercer efectos regulatorios en la autorenovación, proliferación y diferenciación de HSC (Phinney D, 2007; Chen Y et al, 2008; van Poll D. et al, 2008; Haynesworth SE et al, 1996 y Majumdar MK et al, 1998 en da Silva Meirelles et al, 2009).
  - Neovascularización: La angiogénesis durante la curación de una herida es fundamental en la recuperación de los tejidos afectados siendo, quizá, una de los efectos más importantes que pueden ejercer las MSC. Este efecto proangiogénico se ha demostrado con diversos estudios, como el realizado por Kinnaird T et al (2004) empleando modelos de isquemia en extremidades; el modelo de infarto cardíaco en conejos efectuado por Wang Jian-an et al (2005) o el realizado por Hung SC et al (2007) donde los MC de MSC pueden inhibir la apoptosis de células endoteliales cultivadas en hipoxia así como pueden promover la formación de estructuras similares a capilares *in-vitro*.
- Efectos inmunomodulatorios: Las propiedades inmunomodulatorias de las MSC se han demostrado en múltiples trabajos, por ejemplo, los de Di Nicola M et al (2002), Krampera M et al (2003), Rasmusson I et al (2007) y Martinet L et al (2009), citados en da Silva Meirelles et al (2009), donde reportan que las MSC pueden inhibir la proliferación de células T. También se ha reportado como las MSC pueden inhibir o promover la proliferación de células B, suprimir la actividad de células natural killers (NK) y pueden modular el perfil de secreción de citoquinas de células dendríticas y macrófagos (Aggarwal S et al, 2005;

Corcione A et al, 2006; Sotiropoulou PA et al, 2006; Spaggiari GM et al, 2006; Traggiari E et al, 2008 y Nemeth K et al, 2009 en da Silva Meirelles et al, 2009).

- Efectos anticicatriz: En una situación de lesión de un tejido, los pericitos (células perivasculares que pueden actuar como MSC locales) empiezan a secretar HGF en respuesta a bFGF con claros efectos antifibróticos e inmunomodulatorios y, al ser administradas MSC expandidas en cultivo, aumenta la producción de HGF, siempre y cuando dicha administración sea antes que se produzca una fibrosis masiva (da Silva Meirelles et al, 2008 y Suga H et al, 2008 en da Silva Meirelles et al, 2009).
- Efectos quimioatrayentes: Los efectos paracrinicos de las MSC son referidos como efectos tróficos producidos por diferentes moléculas quimioattractantes como la MCP-1, CCL3 (MIP-1 $\alpha$ ), CCL4 (MIP-1 $\beta$ ), etc., igualmente citoquinas paracrinicas y FC que pueden actuar sobre monocitos, eosinófilos, neutrófilos, células T inactivas y de memoria, células B, células NK y progenitores endoteliales entre otras (Kinnaird T et al, 2004 en da Silva Meirelles et al, 2008; van Poll D. et al, 2008).

**1.5.6. Modelos animales y ensayos clínicos con MSC.** Múltiples estudios han obtenido resultados donde las MSC muestran el potencial que tienen para reparar tejidos, y en humanos han sido empleadas para el tratamiento de diferentes enfermedades (Keating 2006 en Chen, L et al, 2008). Vale la pena reseñar algunos trabajos, de diferentes partes del mundo, donde se emplearon MSC, BMMSCs, ADMSCs y mostraron su potencial de reparación.

Los siguientes trabajos fueron realizados empleando diferentes modelos animales (Tabla 3):

**Tabla 3. Trabajos con modelos animales empleando MSC**

MODELO - CÉLULAS EMPLEADAS	RESULTADOS SIGNIFICATIVOS	CONCLUSIÓN(ES) DESTACADA(S)	REF
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Infarto cardíaco en conejos.</li> <li>• BMMSC humanas (hMSC).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mejoró la función cardiaca.</li> <li>• Diferenciación de hMSC en cardiomiocitos.</li> <li>• Regeneración de estructuras vasculares.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sugieren a las hMSC como fuente para trasplantes para reparar daño luego de infarto agudo.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Xiang, Meixiang et al., 2005.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Heridas incisionales cutáneas y en fascia abdominal en ratas.</li> <li>• BMMSCs.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Heridas mejoraron luego de la inyección de BMMSCs.</li> <li>• Mejoró fuerza tensil de la herida.</li> <li>• Maduración histológica rápida</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Terapia celular con BMMSCs tienen potencial para aumentar la curación de heridas.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• McFarlin, Kellie et al., 2006.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Expansión y purificación de MSC de cerdos diferenciadas a células endoteliales vasculares y epidérmicas.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Injertos de MSC tomaron fenotipos de 3 tipos celulares distintos.</li> <li>• Heridas realizadas a los cerdos, mejoraron con MSC.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Las MSC entregadas localmente mejoran la curación de las heridas resultando en una adecuada regeneración de la piel.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fu, Xiaobing et al., 2006.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Modelo murino de isquemia renal y daño por reperfusión.</li> <li>• MSC de médula ósea</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• La administración de MSC atenuó daño renal.</li> <li>• Niveles de urea plasmática y creatinina sérica redujeron</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• El potencial de MSC para modular isquemia y daño por reperfusión que conduce a regeneración temprana del</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Semedo, P. et al., 2007.</li> </ul>

de rata.	luego de la reperfusión. <ul style="list-style-type: none"> <li>Regeneración de tejidos renales más rápido con MSC.</li> </ul>	tejido lesionado.	
<ul style="list-style-type: none"> <li>Modelo murino de heridas de grosor total.</li> <li>ADMSCs en proceso de curación de heridas.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Las ADMSCs redujeron el tamaño de la herida.</li> <li>Las ADMSCs aceleraron reepitelización.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Las ADMSCs están adaptadas para curación de heridas.</li> <li>Los FC derivados de las mismas promueven la curación de heridas.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Kim, Won-Serk et al., 2007.</li> </ul>

Dentro de los estudios y ensayos clínicos se pueden mencionar los siguientes (Tabla 4):

**Tabla 4. Ensayos clínicos donde se emplearon MSC como opción terapéutica**

PATOLOGÍA – NÚMERO DE PTES – TTO APLICADO	RESULTADOS SIGNIFICATIVOS	CONCLUSIÓN(ES) DESTACADA(S)	REF
<ul style="list-style-type: none"> <li>Heridas crónicas que no curan</li> <li>3 pacientes</li> <li>BMMSC</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Cierre de las heridas y</li> <li>Reconstrucción termal</li> <li>Se observó injerto adecuado de células aplicadas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Reconstrucción dermal y cierre de heridas en todos los pacientes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Badiavas, E. y Falanga; V, 2003</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>Enfermedad de Buerger</li> <li>34 pacientes</li> <li>Transplante autólogo de BMMSCs</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>13 pacientes presentaron curación de heridas que no curaban</li> <li>16 pacientes presentaron desarrollo de vasos sanguíneos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>El transplante de BMMSCs es un medio simple, seguro y efectivo de inducir angiogénesis en pacientes con esta enfermedad</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Kim, Dong-II et al., 2006</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>Daños por radiación</li> <li>Estudio mixto con pacientes y ratones desnudos</li> <li>Uso de hMSC en modelos de lesión por radiación severa</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Al combinar hMSC, bFGF y Pelnac® en lesiones por radiación aguda hay mejoría en la reparación de la piel</li> <li>Hay menos tejido necrótico</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Proponen opciones terapéuticas para el tratamiento de lesiones por radiación tanto local como sistémica de piel y tejidos blandos.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Akita, Sadanori et al., 2007</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>Dermopatías de difícil curación</li> <li>20 pacientes</li> <li>Injertos de piel artificial con BMMSC humanas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>La mayoría de las heridas curaron en 18 de los 20 pacientes</li> <li>El trasplante de BMMSC fue terapéuticamente efectivo</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>El compuesto para injertos de piel artificial y MSC es una técnica excelente, poco invasiva y con gran potencial.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Yoshikawa, Takafumi et al., 2008</li> </ul>

**1.5.7. Posibles efectos colaterales del tratamiento con MSC.** A pesar de las múltiples ventajas que puede representar la aplicación de MSC, diversos estudios han reportado algunos efectos adversos o la posibilidad de que puedan llegar a presentarse:

- Houghton J et al, en 2004, reportaron como células madre de médula ósea, contribuyeron a la aparición de cáncer gástrico al asociarse a *Helicobacter pylori* bajo condiciones de inflamación crónica (Houghton J et al, 2004 en Yen B, 2008)

- La evidencia aportada por Zhu et al, en 2006, permite apreciar que las MSC, al inyectarse por vía subcutánea junto con células tumorales, aumentan el tamaño del tumor al aumentar las tasas de necrosis tumoral y de angiogénesis (Zhu et al, 2006 en Lepperdinger G et al, 2008)
- Sundin et al, en 2006, describen como 3 de nueve pacientes, a quienes se les administraron MSC, desarrollaron infecciones virales (Sundin M et al, 2006 en van Poll D. et al, 2008).
- En 2007, el equipo de Matushansky et al, sugieren que, teóricamente, las MSC pueden ser tumorigénicas a través de varios mecanismos. Así mismo, también insinúan que las MSC se pueden transformar en sarcomas cuando la vía de señalización Wnt es suprimida (Matushansky I et al, 2007 en van Poll D. et al, 2008).
- Resultados similares obtuvo Djouad et al, con estudios en modelos animales, donde observó como aumentaba el crecimiento de tumores luego del trasplante de MSC (Djouad F et al, 2003; Djouad F et al, 2006 en van Poll D. et al, 2008).
- Los resultados del trabajo de Karnoub et al, en 2007, demostraron que, al mezclarse MSC con células tumorales, estas últimas aumentaron su potencial metastásico de algunas líneas celulares que originan cáncer de seno, debido a la secreción de CCL5 (también llamado RANTES) por parte de las MSC (Karnoub et al, 2007 en Yen, 2008)
- También en 2007, Dwyer RM et al, demostraron como células cancerosas de seno eran las responsables del alojamiento de MSC, tanto a nivel local como sistémico, debido a que dichas células cancerosas secretaron proteína quimotáctica de monocitos-1 (MCP-1) (Dwyer RM, 2007 en Yen B.L. et al, 2008)
- En 2008, Valfre Di Vonzo et al, reportan como MSC que han sido transplantadas muestran un potencia profibrogénico que pueden incrementar la fibrosis hepática (Valfre Di Vonzo et al, 2008 en Chen Y et al, 2008).
- Lazennec y Jorgensen, 2008, publican acerca del reclutamiento de MSC por parte del estroma de tumores en proceso de desarrollo al ser inyectadas de manera sistemática en diferentes modelos animales de gliomas, cáncer de colon, sarcoma de Kaposi y otros, promoviendo el crecimiento de estos cánceres (Lazennec y Jorgensen, 2008 en Lepperdinger G et al, 2008)
- Al emplear MSC transplantadas se han notado bajos niveles de injerto a largo plazo y las inyecciones intravenosas de MSC tienen efectos a corto plazo ya que pueden ser inhibidas o sus efectos contrarrestados dentro del cuerpo.

## **1.6. MEDIOS CONDICIONADOS (MC)**

**1.6.1. Concepto de Medios Condicionados (MC).** Los MC son los medios en el que se han cultivado células por un determinado tiempo, los cuales contienen FC y citoquinas secretados por las células cultivadas y liberadas al medio, responsables de la actividad biológica de los mismos y que pueden promover el crecimiento de nuevas células. (<http://www.copewithcytokines.de>)

**1.6.2. Condicionamiento y obtención de MC.** Para condicionar un medio en particular ((DMEM), Ham's F12, RPMI 1640, Iscove's, McCoy's, etc) se pueden emplear células modificadas genéticamente para alterar la concentración de uno o más componentes en el medio al sobreexpresar o introducir una nueva proteína, y el medio se procesa según su propósito de utilización, además puede ser suplementado con los componentes necesarios para soportar el crecimiento de las células. Estas células, preferiblemente de origen humano, pueden ser células estromales, MSC, células de reserva hepáticas, células madre neurales, células madre pancreáticas y/o ESC y cultivadas en monocapas, esferas o en constructos tridimensionales y por cualquier medio (platos de cultivo, sistemas de flujo continuo, etc.) creciendo en monocapas sobre un sustrato artificial, siendo el plástico el de más aceptación. (<http://www.pharmcast.com>; <http://www.patentstorm.us>)

La remoción de las células del MC es un paso necesario para procesar el sobrenadante resultante. Este procesamiento puede incluir concentración por un dispositivo de filtración por flujo de agua o empleando productos para aislamiento y purificación para remover proteasas, cromatografía en gel, etc. El método de remoción y concentración dependerá de la aplicación a la que se destine el MC y se deben mantener las medidas de esterilidad del MC teniendo cuidado de preservar la actividad biológica deseada (<http://www.patentstorm.us>).

**1.6.3. Usos y formas de empleo de los MC.** Una vez el medio de cultivo es condicionado con muchos de los componentes originales del medio de cultivo así como metabolitos celulares y proteínas secretadas por las células se puede utilizar en cualquier estado físico y puede ser formulado con un transportador farmacológicamente aceptado; además, el MC puede ser concentrado o reducido a uno o más factores o componentes contenidos dentro del medio (<http://www.pharmcast.com>; <http://www.patentstorm.us>).

En el caso de la curación de heridas, los MC pueden ser aplicados, por ejemplo, en gasas y en aplicaciones tópicas que contienen las proteínas regulatorias de dicho proceso. Además, pueden combinarse con otros ingredientes farmacéuticos como antibióticos y analgésicos para ampliar el efecto terapéutico del MC; mejorando el reclutamiento de células como leucocitos y fibroblastos en el área lesionada e induciendo la proliferación celular y diferenciación resultando en una mejoría en la curación de la herida (<http://www.patentstorm.us>).

**1.6.4. MC de MSC.** Las MSC cultivadas también secretan FC a los medios de cultivo, los cuales pueden promover la proliferación celular y la angiogénesis, mejorando y acelerando la curación de la herida (Short B., 2003 en Chaparro, 2006; Kim W-S et al, 2007; Chen, L et al, 2008).

Los FC que las MSC secretan, junto con las citoquinas, permiten que presenten una gran capacidad de reparación y regeneración de tejidos no hematopoyéticos (Tabla 5) (Kapoor M. et al, 2006; Kim W-S et al, 2007). En diversos experimentos en que han usado MC de MSC cultivadas, los factores paracrinos secretadas por estas células fueron mostrados como los responsables de los efectos terapéuticos (van Poll D. et al, 2008).

Los MC de MSC tienen un efecto similar a las MSC en el proceso de reepitelización, además ejercen *in vivo* un efecto quimioatractivo para macrófagos, células endoteliales y queratinocitos epidérmicos y pueden también regular la migración celular de fibroblastos acelerando el cierre de las heridas al incrementar la producción de colágeno I por parte de los fibroblastos. Estos efectos se han evidenciado tanto con MC de MSC de médula ósea como de tejido adiposo (Kim W.S et al, 2007, Chen L et al, 2008 y Lee E.Y. et al, 2009 en Hocking AM, 2010)

**Tabla 5. Principales FC secretados por MSC y que son reportados en diferentes artículos**

Factores de crecimiento	
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
VEGF	Factor de crecimiento vascular endotelial
EGF	Factor de crecimiento epidermal
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
KGF	Factor de crecimiento de queratinocitos
TGF- $\alpha$	Factor de crecimiento transformante alfa
TGF- $\beta$ 1, 2 y 3	Factor de crecimiento transformante beta
bFGF	Factor de crecimiento de fibroblastos básico
IGF	Factor de crecimiento de insulina
IL-1 $\alpha$ y $\beta$	Interleukina-1 alfa y beta
IL-6	Interleukina-6
IL-8	Interleukina-8
IL-10	Interleukina-10
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa

Algunos de los trabajos, tanto *in vitro* como *in vivo*, que apoyan el empleo de MC como alternativa terapéutica en diferentes patologías son:

**Tabla 6. Trabajos donde se emplean MC como opción terapéutica en diversas patologías**

MC EMPLEADO	RESULTADOS SIGNIFICATIVOS	CONCLUSIÓN(ES) DESTACADA(S)	REF
•MC de monocapas de células endoteliales microvasculares porcinas (PMVEC CM)	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Se mejoró <i>in vitro</i> la proliferación y producción de células hematopoyéticas y la formación de colonias celulares de células progenitoras hematopoyéticas humanas; al combinar PMVEC CM con FC como IL-3</li> <li>•Se mejoró la proliferación y crecimiento de células hematopoyéticas CD34+</li> <li>•Los FC hematopoyéticos soportaron la proliferación y formación de colonias de células progenitoras de médula de ratón, primates y cerdos</li> </ul>	•Los PMVEC CM contienen una novedosa actividad hematopoyética temprana; el PMVEC CM es más efectivo que los FC aplicados en forma individual; no hay una aparente restricción entre especies en la actividad de los FC lo que sugiere un alto grado de conservación a través de la evolución	•Davis TA et al., 1997
•MC de osteocitos de médula ósea de ratón que	•Incremento significativo en la actividad de fosfatasa alcalina y la expresión de osteocalcina en	•Los MC de BMMSC tiene efecto estimulador en células progenitoras de médula ósea	•. Heino, TJ et al., 2004

estimulan la proliferación de BMMSC y su diferenciación a osteoblastos.	presencia del MC •Aumentó casi cuatro veces la formación de hueso y más de dos veces la proliferación de MSC	•Las células estimuladas con MC de BMMSC posiblemente secretaron factores paracrinos mejorando la proliferación de MSC	
•MC de MSC expuestos a hipoxia comparados con MC expuestos a normoxia sobre células endoteliales aórticas humanas	•Los MC expuestos a hipoxia pueden inhibir la apoptosis inducida por hipoxia •Promueven formación de tubo por parte de las células endoteliales aórticas humanas •Activan las vías PI3K-Akt y ERK	•La administración de MSC o sus factores secretados pueden proveer un método terapéutico en patologías que involucren células endoteliales.	•Hung, SC et al., 2007
•Modelo con ratas de vasoconstricción pulmonar hipóxica •MC de MSC de médula ósea humana	•MC de MSC atenúan este efecto	•MSC contribuyeron al remodelamiento vascular en hipoxia crónica •MSC atenuan vasoreactividad en hipoxia pulmonar a través de mecanismo paracrino	•Patel, KM. et al., 2007
•MC de MSC y su efecto en la maduración <i>in Vitro</i> del oocito de ratón así como el crecimiento folicular en el ovario cultivado en agar	•El MC produjo una alta tasa de maduración (91.2%) respecto a los otros medios •El MC mejoró significativamente el desarrollo del embrión a blastocisto respecto a 2 de los medios de cultivo •El MC soportó el crecimiento de folículos preantrales en agar	•El MC de MSC es un efectivo medio para estimular el crecimiento folicular preantral, la maduración del oocito y el desarrollo secuencial del embrión	•Ling B. et al., 2008
•MC de MSC derivadas de ESC en un modelo porcino de isquemia y lesión de reperfusión	•El tratamiento con MC de MSC intravenoso e intracoronario redujo el estrés oxidativo nuclear miocárdico •Se redujo la apoptosis disminuyendo un 60% el tamaño del infarto •Mejóro la función cardíaca sistólica y diastólica	•Los factores paracrinos de MSC humanas son, probablemente, un complejo grande de moléculas y no solamente moléculas pequeñas; Los MC de MSC son una opción terapéutica promisoría para reducir el tamaño de los infartos en pacientes con infarto agudo de miocardio	•Timmers, L et al., 2008
•Comparación de MC de BMMSC y de fibroblastos en un modelo de herida excisional en ratones	•Los MC de BMMSC mejoraron la migración de macrófagos, queratinocitos y células endoteliales •Los MC de BMMSC aceleraron la curación de la herida	•Los factores liberados por MC de BMMSC reclutan macrófagos y células endoteliales en la herida mejorando la curación de la misma.	•Chen, L et al, 2008
•MC de tejido adiposo obtenido en hipoxia, probados en un modelo excisional en ratones	•El MC disminuyó el área de las heridas realizadas, acelerando la curación de las mismas	•La hipoxia a la que fueron sometidos estos medios, mejoró la curación de las heridas por una sobrerregulación de FC como VEGF y bFGF en las células de tejido adiposo, las cuales también mejoraron su proliferación.	•Lee, EY et al., 2009

En conclusión, la ventaja de la utilización de estos MC es que:

- Se reduce o se evita la probabilidad de efectos indeseados como la angiogénesis tumoral en estados patológicos, la cual se puede presentar por la utilización de MSC, ya que estas pueden migrar desde su sitio de implantación a otros y producir tales efectos (Matushansky I et al, 2007 en van Poll et al, 2008).
- Semejan el ambiente de curación normal de una herida mostrando un efecto quimioatractivo significativamente alto para la migración de monocitos CD14+, queratinocitos y células endoteliales, así como el aumento en la proliferación de estas células comparados con MC de fibroblastos.
- Mejoran y aceleran el cierre de las heridas comparados con medios de control o con MC de fibroblastos (Chen, L et al, 2008).
- La combinación de FC puede ser más benéfico en la curación de heridas que la aplicación individual de FC debido a la interacción sinérgica de estos en el proceso de curación de heridas (Eming SA et al, 1997 en Hom D, 1999)
- Pueden condicionarse estos medios con células maduras adultas que pueden ser modificadas genéticamente para la obtención de MC específicos para heridas de tejidos especializados o para que presenten una proteína o un elemento específico de interés según el propósito de utilización del MC.
- Una vez obtenido el MC, puede ser empleado en diferentes presentaciones y enriquecido con otros componentes farmacológicos para potenciar el efecto terapéutico
- La entrega de solo los productos de las MSC en los MC tiene el potencial de convertirse en una terapia de *"botiquín"* (van Poll D. et al, 2008)

Estas razones nos llevaron a plantear este proyecto de investigación, el cual se constituye en un estudio pionero, para conocer los efectos que tienen MC de MSC de médula ósea y tejido adiposo en heridas con un modelo animal simple como es el murino en aspectos básicos del proceso de cicatrización y cuyos resultados pueden dar importantes luces que conduzcan a otros proyectos que mejoren los MC como posibilidad de tratamiento de heridas crónicas.

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Diariamente en nuestro país se presentan a los servicios hospitalarios cientos de personas heridas quienes pueden, potencialmente, presentar dificultades durante la recuperación y cicatrización de sus heridas por diversos factores como la extensión de la herida, la profundidad de la misma, el objeto o causa de la misma, la presencia o no de infección, la necesidad de ser suturada o no, el estado nutricional, etc.

Para el tratamiento de estas heridas se requiere conocer su etiología y severidad, especialmente cuando se trata de heridas crónicas y que presentan lenta cicatrización ya que esta clase de heridas están expuestas a diversas infecciones y conducir al paciente a la muerte, además que pueden tener repercusiones a nivel psicológico y/o comportamental así como sentimientos de minusvalía. Estos tratamientos pueden originar sensaciones de pesimismo para los pacientes, incluso para el personal que lo atiende.

La incapacidad generada a estas personas, de acuerdo a los factores anteriores, genera enormes pérdidas, de manera directa como indirecta, a la sociedad y al erario. Según el Departamento Nacional de Planeación, los costos directos del Estado para el periodo 1999-2003 generados por la violencia armada en el país fueron de 264.346 millones de pesos de 2003, solo por concepto de pérdida de productividad de personas heridas con minas antipersona. De otra parte, según datos del Ministerio de Transporte, al año se presentan 50000 heridos por accidentes de tránsito, siendo los más afectados las personas que se encuentran entre los 18 y 35 años, es decir, en edad productiva, con las consabidas pérdidas económicas. (Wallerstein N, 2000).

Estas cifras se ven aumentadas con las reportadas por las secretarías de salud de los diferentes departamentos y ciudades. Según datos, solo de la Secretaría de Salud de Bogotá, en esta ciudad, entre el año 2000 y 2005, hubo 470 niños quemados por pólvora los cuales presentaban en su mayoría quemaduras de 2 y 3er grado en una extensión considerable del cuerpo, lo que a la postre, dificultará la curación de las mismas y puede tener efectos deformantes en el paciente al finalizar el proceso de curación y cicatrización.

En las personas diabéticas, sus heridas pueden empeorar si existen otras anomalías patofisiológicas (neuropatía, problemas vasculares, hipertensión arterial, etc.) asociadas a la enfermedad primaria y la presencia de otros factores externos (infección, formación de callo y presión excesiva en el sitio de la herida), con lo que el periodo de hospitalización se prolonga y se puede producir la pérdida de la(s) extremidad(es) afectadas (Jeffcoate WJ et al, 2004 en Falanga, 2005)

Así bien, a nivel mundial el cuerpo médico y científico han mejorando los diferentes tratamientos clínicos existentes o han innovando tecnologías de mayor complejidad con la finalidad de tratar diferentes heridas (Barroetabeña Reyes A et al, 2000; Atiyeh, B S et al, 2005; Akita, S., 2007).

En los últimos años, una de las opciones que promete buenos resultados terapéuticos, ha sido la terapia celular por sus facilidades de aplicación. Dentro de este campo de la terapia celular, se destaca el hecho de emplear células madre (SC), células madres mesenquimales (MSC) extraídas de tejido adiposo (ADMSCs) o

de médula ósea (BMMSCs) (Kinnaird T et al, 2004 en Ocke P, 2005; Fu et al, 2006, Sun et al, 2006; Kim W-S et al, 2007; Badiavas E, 2003).

Las MSC son células progenitoras estromales multipotentes que migran a sitios donde hay daño y pueden presentar un potencial terapéutico (Liechty et al, 2000; Pochampally et al, 2004 en Le Blanc, 2007). Estas MSC, al ser aisladas y expandidas *ex vivo* muestran capacidad de diferenciación en diferentes linajes celulares de origen mesenquimal como condrocitos, adipocitos y osteocitos. También ha sido documentado que las MSC pueden diferenciarse a otros tipos de células de origen diferente al mesenquimal como neuronas y tejidos epiteliales (Chapel A et al, 2003; Sugaya K, 2003; Deng Y et al, 2003; Ortiz LA, 2003 en Le Blanc, 2007; Mc Taggart S, 2007)

Estas células producen y liberan diferentes factores de crecimiento (FC), los cuales permiten que las MSC presenten una gran capacidad de reparación de tejidos no hematopoyéticos. Estos FC son liberados, por medio de un mecanismo paracrino, al medio de cultivo convirtiéndose así en un medio condicionado (MC), los cuales pueden ser empleados en tratamientos para promover proliferación de fibroblastos, células epidérmicas y la generación de nuevos vasos sanguíneos, mejorando y acelerando el proceso de curación de una herida (Hom, D., 1999; Short B., 2003 en Chaparro, 2006; Hong et al, 2006; Kapoor M. et al, 2007; Kim W-S et al, 2007, Chen, L et al, 2008).

Este proyecto hace parte de un macroproyecto de investigación en células madre donde se pretende ver el efecto *in vivo* de los medios condicionados en heridas de piel de ratones para comparar su efectividad durante el proceso de curación de las mismas. Este trabajo se complementa con los trabajos de caracterización de los medios condicionados, el proyecto de angiogénesis con segmentos de cordón umbilical, regeneración medular y curación de heridas óseas, y que se tiene la confianza en que, cada uno de estos y entre todos, harán un aporte importante al avance del conocimiento en esta temática.

## **3. OBJETIVOS**

### **3.1. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto de los medios condicionados de células madre mesenquimales, provenientes de tejido adiposo y de médula ósea humanos obtenidos en condiciones de normoxia e hipoxia, sobre el proceso de cicatrización, en heridas de piel en un modelo murino.

### **3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Evaluar el efecto de estos medios condicionados en la dinámica del cierre de heridas de piel en ratones.
- Analizar los hallazgos histopatológicos presentados en las zonas de las heridas en términos de reepitelización, tejido de granulación, células inflamatorias y angiogénesis luego de ser tratadas con la aplicación de cada uno de los medios condicionados de células madre mesenquimales provenientes de tejido adiposo y de médula ósea humano

## **4. HIPÓTESIS**

### **4.1. HIPÓTESIS NULA**

Existe mejoría en el proceso de cicatrización de heridas limpias practicadas en la piel de ratones sanos luego de ser tratadas con medios condicionados de células madre mesenquimales humanas, obtenidos en condiciones de hipoxia y normoxia

### **4.2. HIPÓTESIS ALTERNA**

No existe mejoría en el proceso de cicatrización de heridas limpias practicadas en la piel de ratones sanos luego de ser tratadas con medios condicionados de células madre mesenquimales humanas, obtenidos en condiciones de hipoxia y normoxia.

## 5. METODOLOGÍA

### 5.1 FLUJOGRAMA DE LA METODOLOGÍA

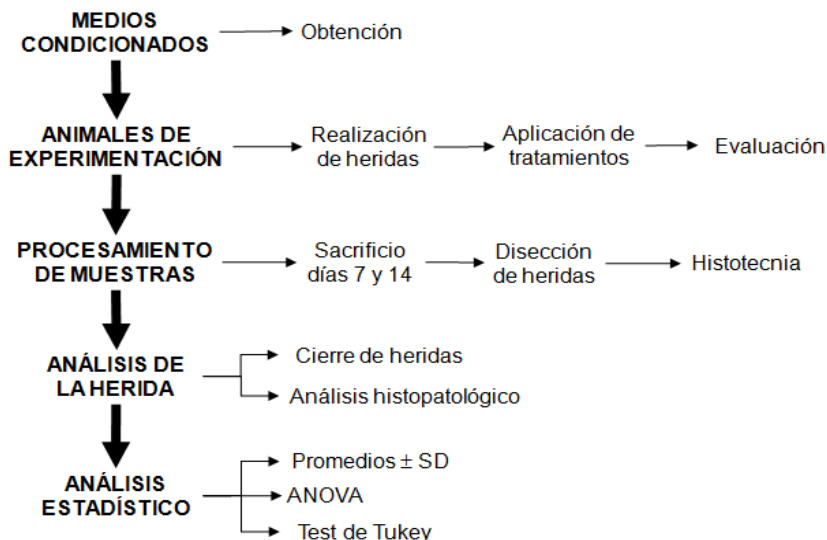


Fig. 4. Flujograma de la metodología

### 5.2 OBTENCIÓN DE LOS MEDIOS CONDICIONADOS

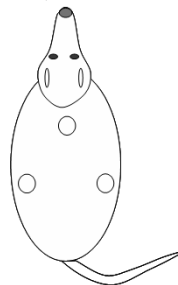
Las MSCs de médula ósea y tejido adiposo entre 5 -7 pase son sembradas a una concentración de  $1-5 \times 10^6/\text{ml}$  en frascos T de 25ml (Greiner) con medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle medium (DMEM marca GIBCO™) suplementado con L-Glutamina  $10^{-4}$  M, 10 % de suero bovino fetal (SBF marca GIBCO™), penicilina 100 U/ml, estreptomycin 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  e incubadas a  $37^\circ\text{C}$  en atmósfera húmeda con 5% de  $\text{CO}_2$ . Luego de alcanzar un 60% de confluencia, se retira el medio, se realizan tres lavados con PBS y se adicionan 5 ml de medio libre de suero OptiMEM Modified Eagle Medium (Opti-MEM® marca GIBCO™). Posteriormente, las células se incuban en condiciones de normoxia e hipoxia por 24 horas. Para normoxia, se incuban a  $37^\circ\text{C}$  con 21% de oxígeno; para hipoxia, se incuban a  $37^\circ\text{C}$  y 2% de oxígeno.

Los MC de BM-MSCs y Ad-MSCs son recolectados en tubos Falcon de 15 ml a las 24 horas de incubación y se les adiciona Aprotinina 15  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (SIGMA-ALDRICH) y son centrifugados a 1300 rpm por 30 min y filtrados con membranas de  $0,2\mu\text{m}$  (SIGMA-ALDRICH).

### 5.3. TRABAJO CON ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Se utilizaron 24 ratones machos normales Balb/c divididos en 3 grupos; cada ejemplar estuvo marcado en la cola con anillos empleando marcadores indelebles. Los sujetos tuvieron agua y comida *ad libitum*. Se empleó anestesia subcutánea mezclando ketamina (20mg/Kg) y acepromina (10 mg/Kg), se afeitó y desinfectó la

región dorsal de cada individuo. Luego se realizaron 3 heridas dorsales, de espesor total, de 5 mm de diámetro aproximadamente, empleando un punch dermatológico y se cubrieron con Transpore® los primeros 3 días para evitar infección (Dorsett-Martin W A, 2004).



*Fig. 5. Localización de las heridas*

La primera herida se ubicó en la línea media, las otras 2 fueron contralaterales (Fig. 5). La herida medial fue control donde se aplicó Optimem; en cada herida lateral se aplicó un tratamiento seleccionado para compararlos entre si de la siguiente manera:

<b>Ratones Grupo 1.</b> MO-H vs. MO-N	MO-H: Médula ósea hipoxia
<b>Ratones Grupo 2.</b> Ad-H vs. Ad-N	MO-N: Médula ósea normoxia
<b>Ratones Grupo 3.</b> Ad-H vs. MO-H	Ad-H: Tejido adiposo hipoxia
	Ad-N: Tejido adiposo normoxia

En el día 0 se inyectaron intradérmicamente, 100  $\mu$ l de cada uno de los MC en 4 puntos distintos de cada herida y 100  $\mu$ l de Optimem en la herida control, repitiendo este procedimiento cada 24 h hasta completar 3 inyecciones/herida.

#### **5.4. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS**

Para obtener las muestras de piel, se sacrificó 1 sujeto, seleccionado al azar, de cada grupo el día 7 p.h., para comparar con la cicatrización y curación completa de la herida al día 14 p.h., mediante cámara de gas y se realizó la disección de la zona de la herida, incluyendo la piel adyacente a 3-5 mm. (Fathke C. et al, 2004; Enoch S, 2005; Galeano M et al, 2006; McFarlin et al 2006).

Las muestras se colocaron en paraformaldehído al 4% (PFA), posteriormente embebidas en parafinas, se realizaron cortes de 5  $\mu$ m con micrótopo y se colorearon con hematoxilina-eosina (H&E). Se obtuvieron 3 portaobjetos por muestra con 5 cortes en cada una de las placas.

#### **5.5. ANÁLISIS DE LAS HERIDAS**

**5.5.1. Cierre de la herida.** Se fotografiaron las heridas cada día con una cámara digital Canon Power Shot A95 y además se midieron los diámetros de las heridas con un calibrador digital (Fang Y et al, 2007;



## 6. RESULTADOS

### 6.1. CIERRE DE LA HERIDA

En la primera prueba experimental se probaron los MC obtenidos de médula ósea (MO) tanto en condiciones de hipoxia (MO-H) como en normoxia (MO-N) vs el medio de control (C) (Optimem). Para analizar los datos obtenidos se realizó un análisis de varianza para determinar si el promedio de cierre de las heridas (Fig. 6) y el promedio de porcentaje de contracción de las mismas (Fig. 7) con cada uno de los tratamientos son estadísticamente iguales ( $p \geq 0.05$ ) o diferentes ( $p < 0.05$ ) en cada uno de los días (0, 4, 7, 10, 14). Si el ANOVA indica diferencia estadísticamente significativa, se aplica la prueba de comparación múltiple Tukey. Los ANOVAS realizados para cada uno de los días y tratamientos arrojaron los siguientes resultados (tabla 8):

Tabla 8. Resultados de los ANOVAS para la prueba 1: MC de MOH vs MON

DÍA	TRATAMIENTO						*P
	C		MO-H		MO-N		
	$\bar{X}$	%	$\bar{X}$	%	$\bar{X}$	%	
0	5.3±0.36mm	0	5.03±0.07mm	0	5.07±0.14mm	0	0.0568
4	3.40±0.80mm	36.2	2.62±0.48mm	48.0	2.95±0.72mm	42.0	0.0958
7	2.25±1.24mm	57.8	0.31±0.58mm	93.9	1±1.13mm	80	0.0038
10	1.01±1.32mm	81.9	0	100	0.28±0.75mm	94.3	0.1136
14	0.58±0.78mm	89.5	0	100	0	100	0.0382

$\bar{X}$ : Promedio Diámetro de las heridas

% Porcentaje de contracción de la herida

\*P: Valor de  $p < 0.05$  respecto al control

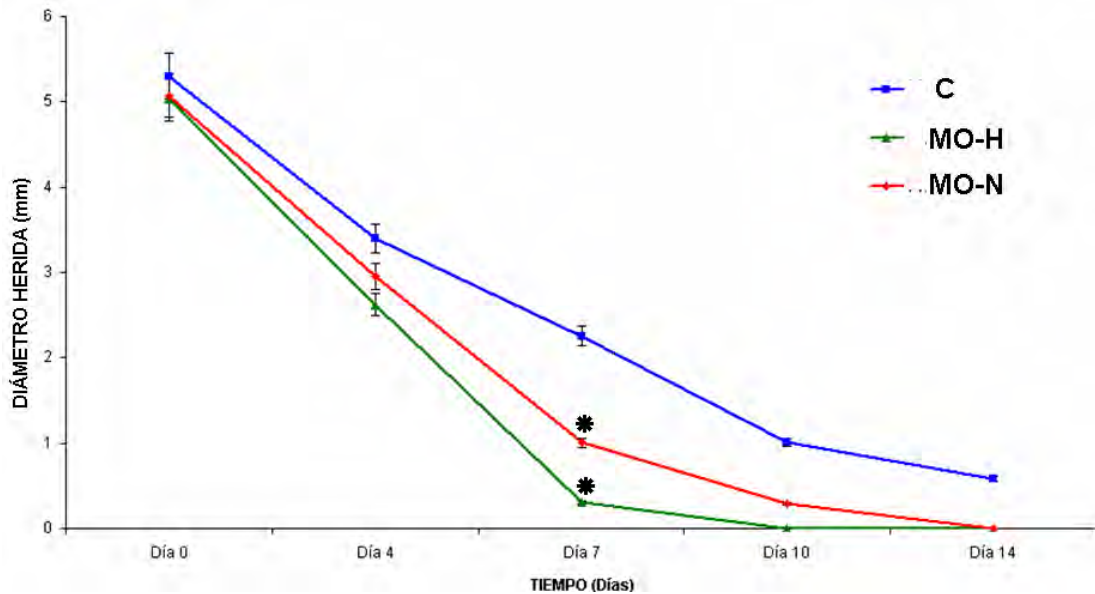


Fig. 6. Cierre de las heridas con MC de MO. Se emplearon los MC de MO-H, MO-N y el medio de control (C) (Optimem). (Anova \*  $p < 0.05$  comparado con el C;  $n = 8$  en los días 0, 4 y 7;  $n = 7$  en los días 10 y 14)

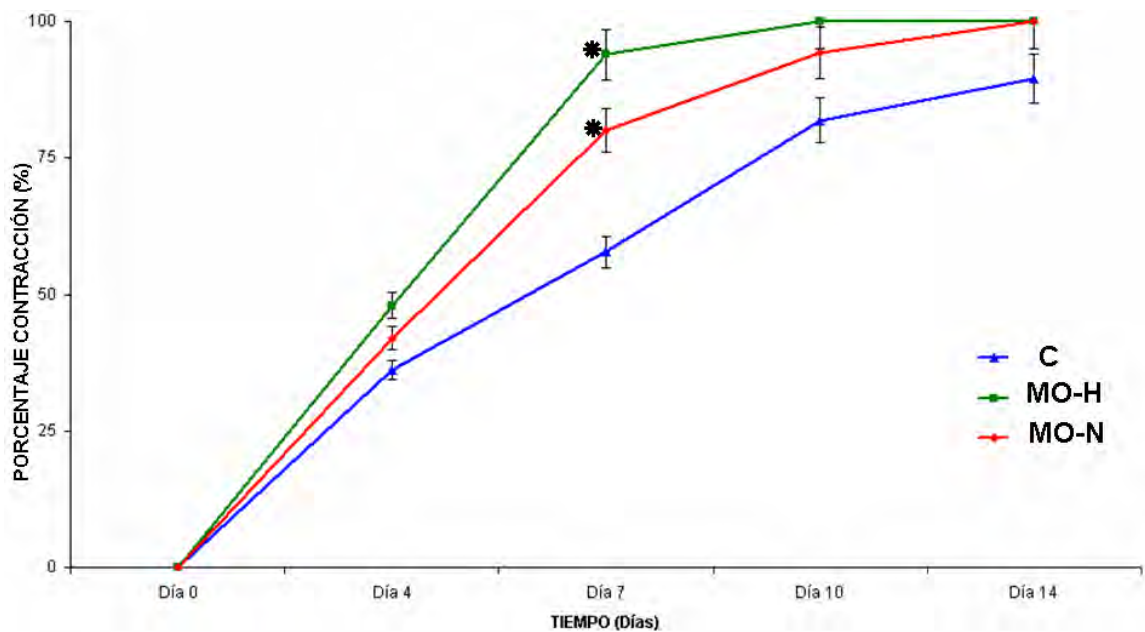


Fig. 7. Contracción de las heridas con MC de MO. Se emplearon los MC de MO-H, MO-N y el medio de control (C) (Optimem). Anova \*  $p < 0.05$  comparado con HC;  $n = 8$  en los días 0, 4 y 7;  $n = 7$  en los días 10 y 14)

En las fotografías se advierte el efecto de estos MC en el cierre de las heridas (Fig. 8).

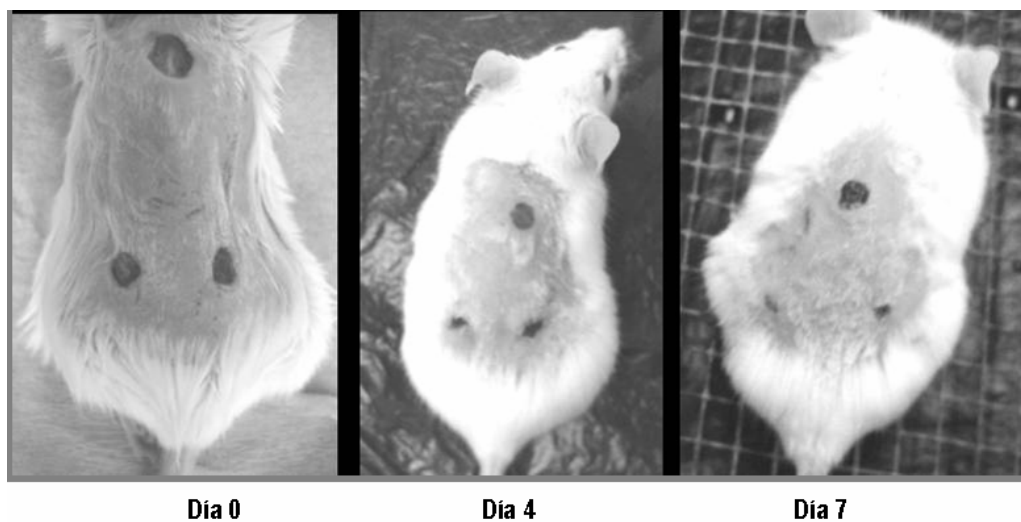
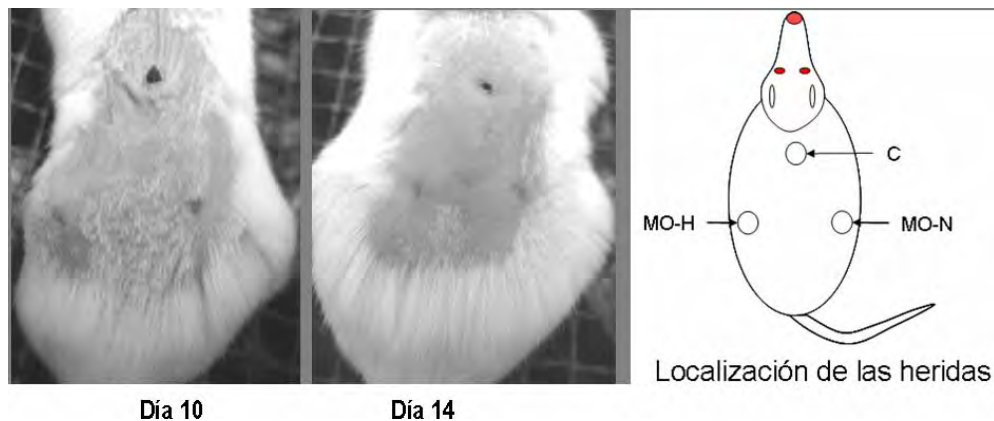


Fig. 8. Evolución del cierre de las heridas con MC de MO. Estado de las heridas luego de la aplicación de los MC de MO-H, MO-N y el medio de control (C) (Optimem) en los días 4, 7, 10 y 14 p.h. Las fotografías corresponden al mismo animal y son representativas del grupo experimental.

Fig. 8. (Continuación)



Durante la segunda prueba experimental, se probaron los MC de tejido adiposo (Ad), obtenidos en condiciones de hipoxia (Ad-H) y en normoxia (Ad-N), además del medio control(C) (Optimem). Para analizar los datos recolectados se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para poder determinar si el promedio de cierre (Fig. 9) y el promedio del porcentaje de contracción de las heridas (Fig. 10), luego de tratarlas con los distintos tratamientos, son estadísticamente iguales ( $p \geq 0.05$ ) o diferentes ( $p < 0.05$ ) en cada uno de los días de control (0, 4, 7, 10, 14) comparado con el control; si el ANOVA indica diferencias estadísticamente significativas, se aplica la prueba de comparación múltiple de Tukey.

Los ANOVAS realizados arrojaron los siguientes resultados (Tabla 9):

Tabla 9. Resultados de los ANOVAS para la prueba 2: MC de Ad-H vs Ad-N

DÍA	TRATAMIENTO						*P
	C		Ad-H		Ad-N		
	$\bar{X}$	%	$\bar{X}$	%	$\bar{X}$	%	
0	4.67±0.48 mm.	0	4.28±0.38 mm.	0	4.51±0.33 mm.	0	0.1827
4	3.68±0.33mm.	20.9	2.54±0.73 mm.	40	3.00±0.57 mm.	33.4	0.0023
7	2.88±0.33mm	38.2	1.39±0.73mm,	67.2	2.20±0.57mm.	51.2	0.0005
10	1.20±0.84 mm.	69.4	0.52±0.51mm.	85.3	0.68±0.66 mm.	87.7	0.1841
14	0±0 mm.	100	0±0 mm.	100	0.06±0.17 mm.	100	0.3874

$\bar{X}$ : Promedio Diámetro de las heridas

% Porcentaje de contracción de la herida

\*P: Valor de  $p < 0.05$  respecto al control

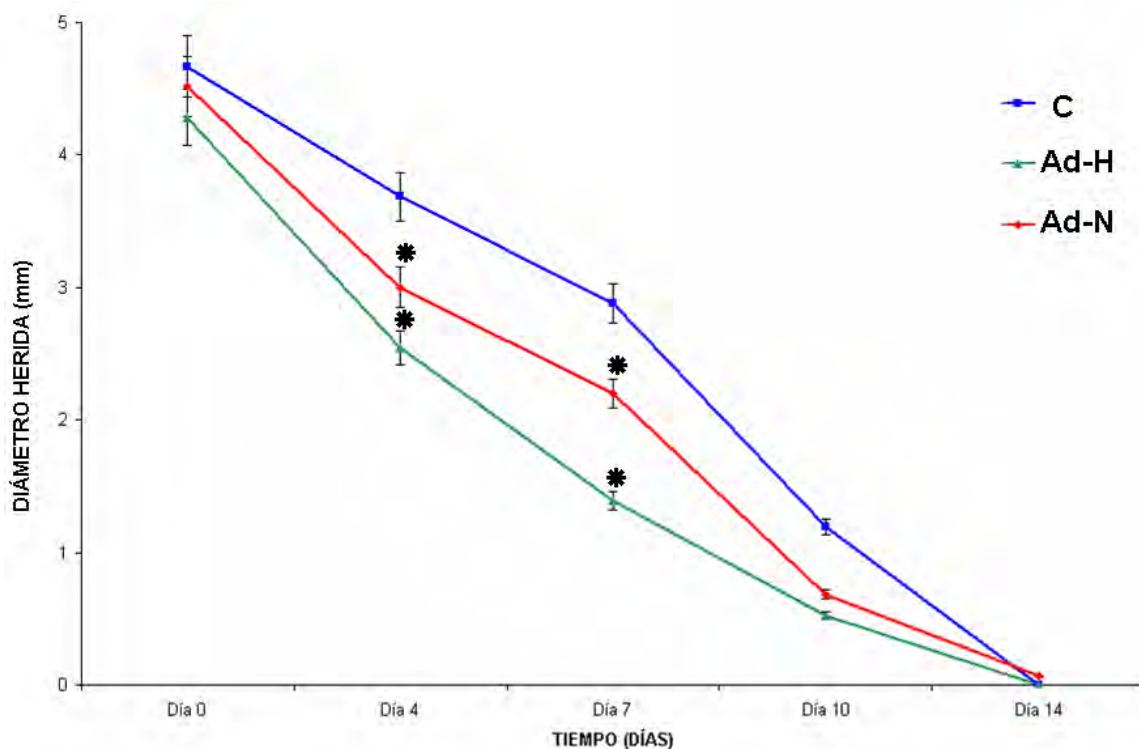


Fig. 9. Cierre de las heridas con MC de Ad. Se emplearon MC de Ad-H, Ad-N y el medio de control (C) (Optimem). Anova \*  $p < 0.05$  comparado con HC;  $n = 8$  en los días 0, 4, 7;  $n = 7$  en los días 10 y 14

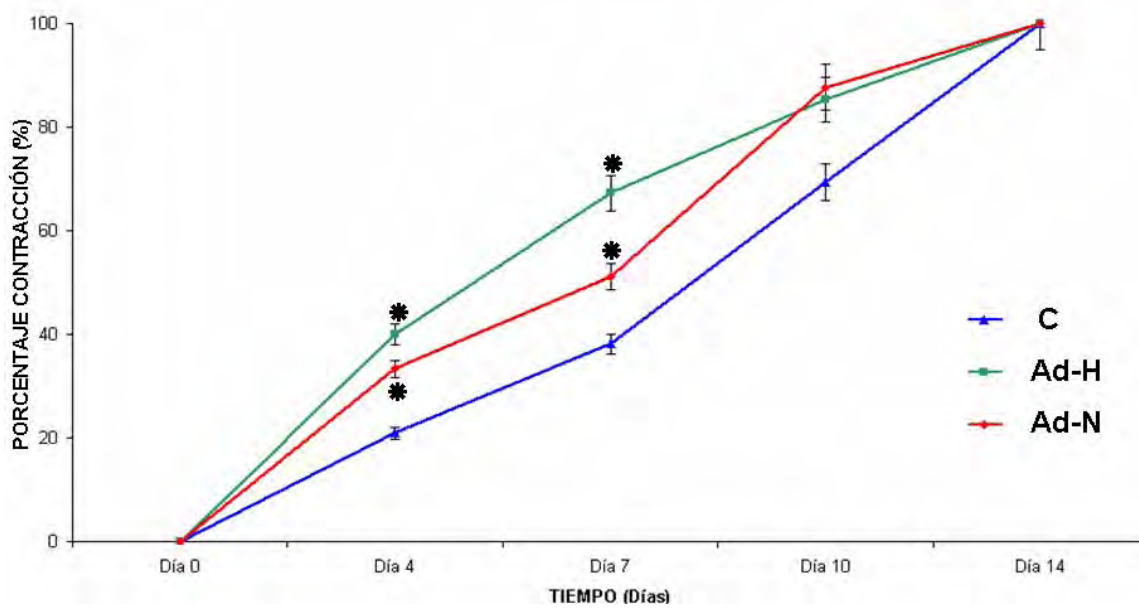
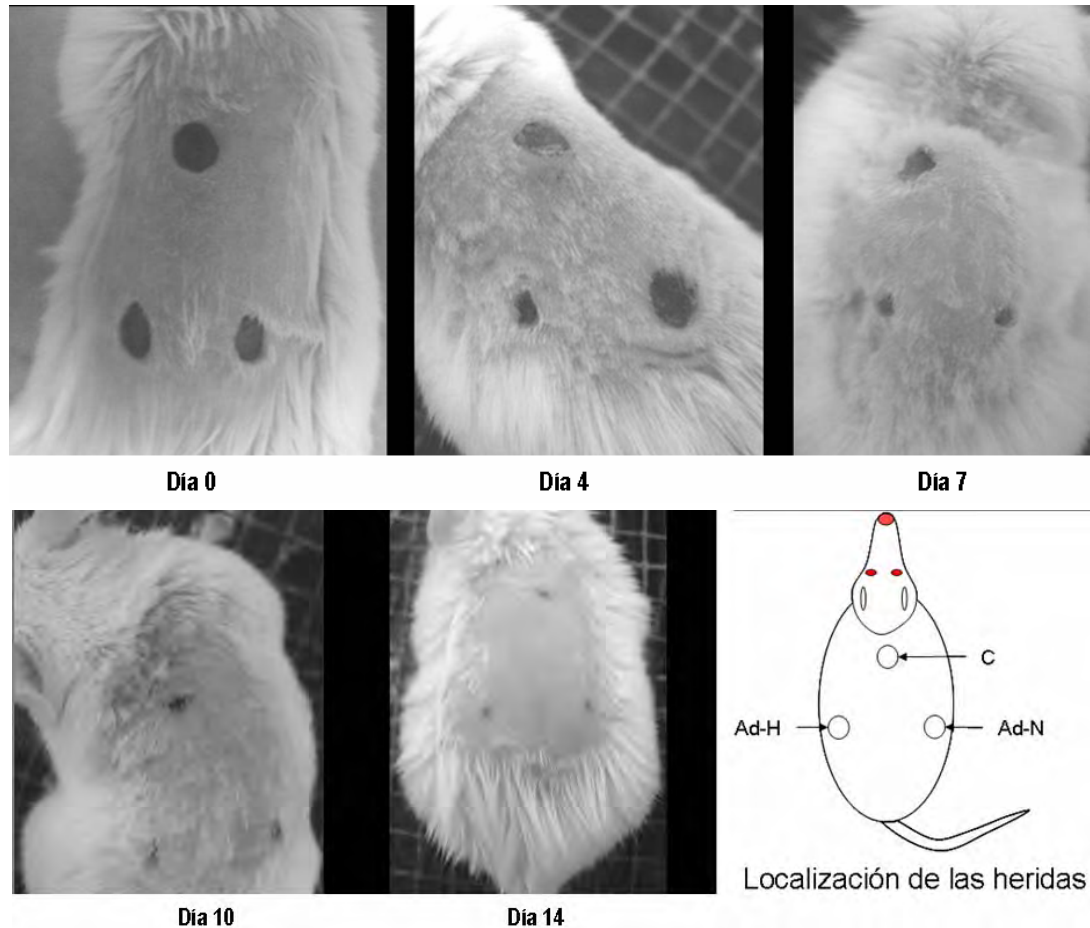


Fig. 10. Contracción de las heridas con MC de Ad. Se emplearon los MC de Ad-H, Ad-N y el medio de control (C) (Optimem). Anova \*  $p < 0.05$  comparado con HC;  $n = 8$  en los días 0, 4 y 7;  $n = 7$  en los días 10 y 14

En las fotografías se advierte el efecto de estos MC en el cierre de las heridas (Fig. 11).



**Fig. 11. Evolución cierre de las heridas con MC de Ad.** Estado de las heridas luego de la aplicación de los MC de Ad-H, Ad-N y el medio de control (C) (Optimem) en los días 4, 7, 10 y 14 p.h. Las fotografías corresponden al mismo animal y son representativas del grupo experimental.

En la 3ª y última prueba experimental se compararon los MC que mejor resultados habían presentado en los ensayos anteriores: los MC de MO-H y de Ad-H. Para analizar los datos recolectados se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para determinar si el promedio de cierre (Fig. 12) y el promedio del porcentaje de contracción de las heridas (Fig. 13), luego de tratarlas con los distintos tratamientos, son estadísticamente iguales ( $p \geq 0.05$ ) o diferentes ( $p < 0.05$ ) en cada uno de los días de control (0, 4, 7, 10, 14) comparado con el control; si el ANOVA indica diferencia estadísticamente significativas, se aplica la prueba de comparación múltiple de Tukey.

Los ANOVAS realizados arrojaron los siguientes resultados (tabla 10):

Tabla 10. Resultados de los ANOVAS para la prueba 3: MC de Ad-H vs MO-H

DÍA	TRATAMIENTO						*P
	C		Ad-H		MO-H		
	$\bar{X}$	%	$\bar{X}$	%	$\bar{X}$	%	
0	4.38±0.28mm	0	4.24±0.45mm	0	4.27±0.32mm	0	0.7164
4	3.29±0.77mm	25	2.79±0.88mm	34.1	2.79±1.03mm	35	0.4592
7	3.03±0.74mm	30.8	1.92±1.40mm	54.3	1.83±1.43mm	58.1	0.1221
10	1.54±0.74mm	65.5	1.09±1.24mm	74.5	0.88±1.11mm	80.1	0.5014
14	0.20±0.53mm	95.8	0.20±0.53mm	94.9	0±0	100	0.5355

$\bar{X}$ : Promedio Diámetro de las heridas

% Porcentaje de contracción de la herida

\*P: Valor de  $p < 0.05$  respecto al control

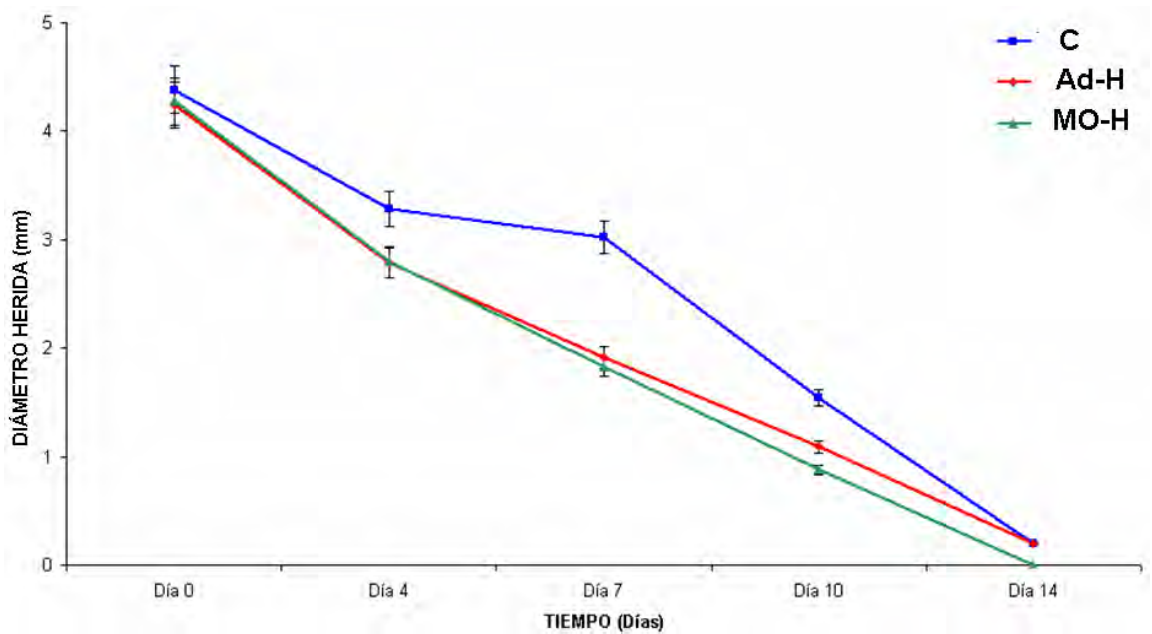


Fig. 12. Cierre de las heridas con MC de MO-H y Ad-H. Se emplearon los MC de MO-H, Ad-H y el medio de control (C) (Optimem). Anova \*  $p < 0.05$  comparado con HC;  $n = 8$  en los días 0, 4, 7,  $n = 7$  en los días 10 y 14)

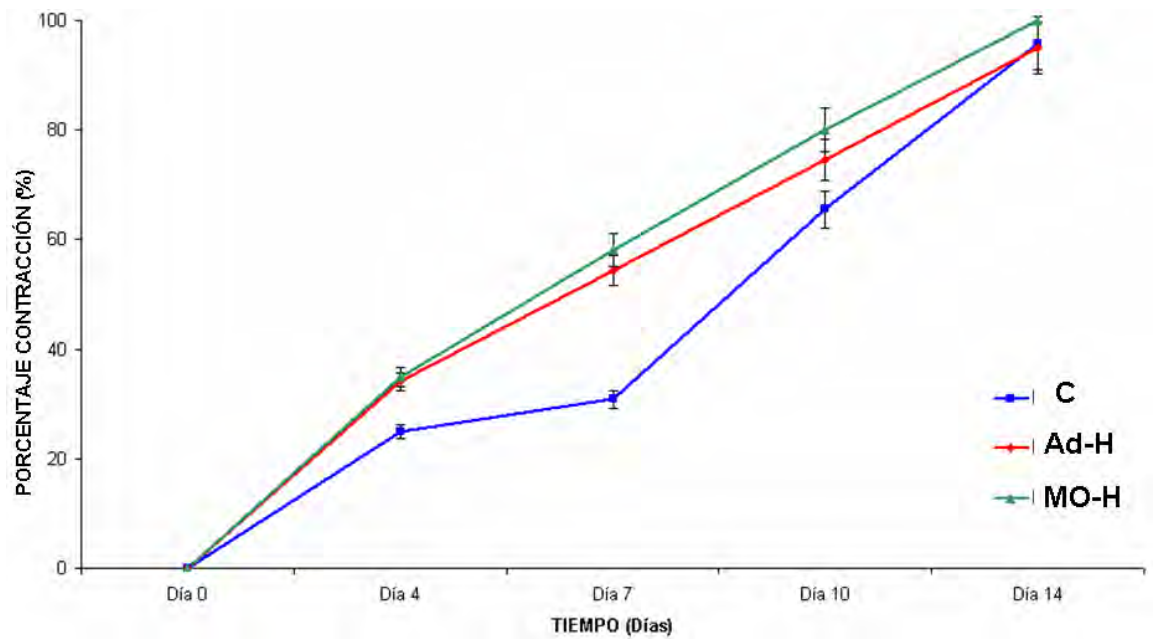


Fig. 13. Contracción de las heridas con MC de Ad-H y MO-H. Se emplearon los MC de Ad-H, MO-H y el medio de control (C) (Optimem). Anova \*  $p < 0.05$  comparado con HC;  $n = 8$  en los días 0, 4 y 7;  $n = 7$  en los días 10 y 14)

En las fotografías se advierte el efecto de estos MC en el cierre de las heridas (Fig. 14).

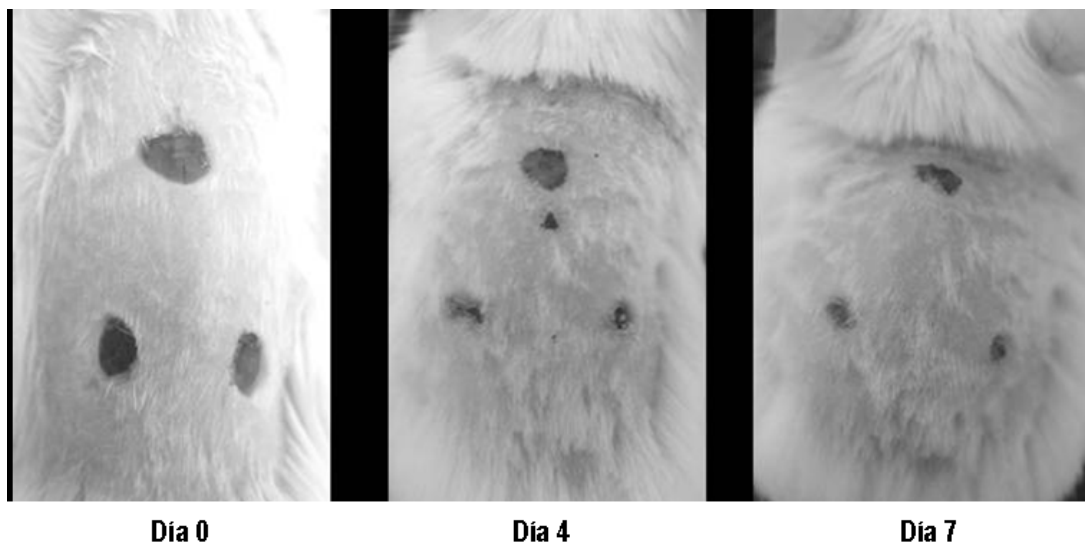
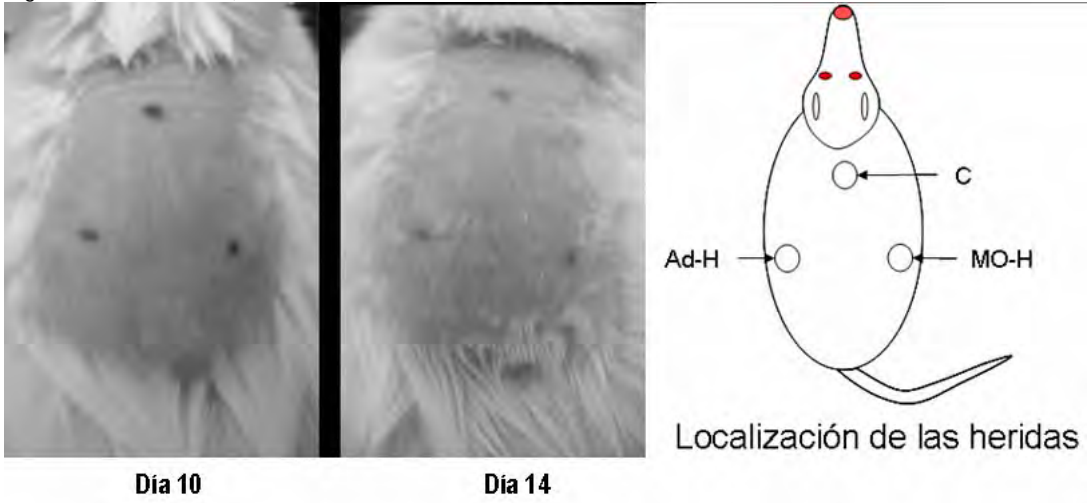


Fig. 14. Evolución Cierre de las heridas con MC de Ad-H y MO-H. Estado de las heridas luego de la aplicación de los MC de Ad-H y MO-H y el medio de control (C) (Optimem) en los días 4, 7, 10 y 14 p.h. Las fotografías corresponden al mismo animal y son representativas del grupo experimental.

Fig. 14. (Continuación)



## 6.2. ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO

La evaluación histológica, realizada por dos histopatólogos veterinarios de manera independiente y sin conocimiento de los tratamientos, de cada uno de los aspectos mostrados en la tabla 3, muestra diferencias entre los procesos de cicatrización de las heridas tratadas con los MC, especialmente los obtenidos en condiciones de hipoxia, respecto a los MC obtenidos en normoxia y el medio control en cada punto de control (día 7° y 14° p.h.). Los principales cambios histológicos observados en las muestras de piel tratadas con los MC y el medio control respecto a la piel normal se pueden apreciar en las tablas 11 - 22 y Figs. 15 - 31

Tabla 11. Cambios en la reepitelización y el tejido de granulación observados el día 7 p.h. con los MC de Ad

DÍA	TRATAMIENTO		
	CONTROL	Ad-H	Ad-N
7	<b>REEPITELIZACIÓN</b>		
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Organización epidérmica moderada en 40-50% del tejido</li> <li>• Hiperqueratosis ortoqueratótica leve</li> <li>• Hiperplasia de leve a moderada</li> <li>• Espongiosis leve</li> <li>• Hay costras ortoqueratóticas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Organización epidérmica completa en 40-50% del tejido.</li> <li>• Hiperqueratosis ortoqueratótica leve</li> <li>• Hiperplasia moderada</li> <li>• Espongiosis leve</li> <li>• Hay costras ortoqueratóticas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Organización epidérmica incompleta en más del 40% del tejido</li> <li>• Hiperqueratosis leve pero paraqueratótica</li> <li>• Hiperplasia moderada a severa</li> <li>• Espongiosis moderada a severa</li> <li>• Costras paraqueratóticas</li> </ul>
	<b>TEJIDO DE GRANULACIÓN</b>		
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Remodelación moderada en un 40% en sus dos capas</li> <li>• Fibroplasia moderada</li> <li>• Hemorragia moderada</li> <li>• No se presenta tejido adiposo en la dermis papilar pero si en la reticular de manera leve</li> <li>• Ausencia anexos dérmicos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Remodelación moderada en el 40% del tejido de granulación</li> <li>• Fibroplasia moderada</li> <li>• Hemorragia leve</li> <li>• Evidente aumento de adipocitos</li> <li>• Ausencia total de anexos dérmicos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Remodelación moderada del tejido de granulación en el 40% del tejido.</li> <li>• Fibroplasia de moderada a severa</li> <li>• Hemorragia leve</li> <li>• Presencia de tejido adiposo moderada en la herida.</li> <li>• Ausencia total de anexos</li> </ul>

Tabla 12. Cambios en el número de células inflamatorias y vasos sanguíneos el día 7 p.h. con los MC de Ad

DÍA	TRATAMIENTO		
	CONTROL	Ad-H	Ad-N
7	<b>CÉLULAS INFLAMATORIAS</b>		
	•Infiltrado mixto moderado a severo (7-10 células por campo)	•Infiltrado de células PMN severo (10-13 células por campo)	• Infiltrado mixto severo (más de 13 células por campo)
	<b>ANGIOGÉNESIS</b>		
	• 3-4 vasos por campo • Congestión leve a moderada • Hemorragia moderada	• Más de 7 vasos por campo • Congestión leve • Hemorragia leve	• 5-6 vasos por campo • Congestión moderada a severa • Hemorragia leve

Tabla 13. Cambios en la reepitelización y el tejido de granulación observados el día 14 p.h. con los MC de Ad.

DÍA	CONTROL	Ad-H	Ad-N
14	<b>REEPITELIZACIÓN</b>		
	•Reepitelización moderada del 50%	•La estructura de la piel y proliferación epitelial fue $\geq$ al 90% del tejido.	•La proliferación y la organización epitelial es moderada en un 60% del tejido
	•Hiperqueratosis ortoqueratótica leve	•Hiperqueratosis ortoqueratótica igual	•Hiperqueratosis ortoqueratótica leve
	•Hiperplasia leve	•Hiperplasia leve	•Hiperplasia moderada
•Edema intercelular leve	•Espongiosis leve	•Edema intercelular moderado	
<b>TEJIDO DE GRANULACIÓN</b>			
•Remodelación del tejido de granulación del 40%	•Maduración y remodelación del colágeno evidente en más del 70% del tejido de granulación	•La remodelación y maduración del tejido de granulación se presenta en un 50% del tejido	
•Fibroplasia moderada	•Fibroplasia leve	•Fibroplasia moderada a severa	
•No hay hemorragia	•No hay hemorragia	•Hemorragia leve	
•Formación leve de tejido adiposo en la capa inferior de la demis	•Formación de tejido adiposo	•No hay tejido adiposo	
•Formación de nuevos anexos dérmicos.	•Nuevos anexos dérmicos	•Ausencia de anexos dérmicos de moderada a severa	

Tabla 14. Cambios en el número de células inflamatorias y vasos sanguíneos el día 14 p.h. con los MC de Ad.

DÍA	CONTROL	Ad-H	Ad-N
14	<b>CÉLULAS INFLAMATORIAS</b>		
	• Infiltrado mixto moderado a severo (7-10 células por campo)	• Infiltrado mixto leve (1-4 células por campo)	• Infiltrado mixto moderado a severo (7-10 células por campo)
	<b>ANGIOGÉNESIS</b>		
	• 3-4 vasos por campo	• 5-6 vasos por campo	• 5-6 vasos por campo
	• Congestión leve	• No hay congestión	• Congestión leve a moderada
	• Hemorragia moderada	• No hay hemorragia	• Hemorragia leve

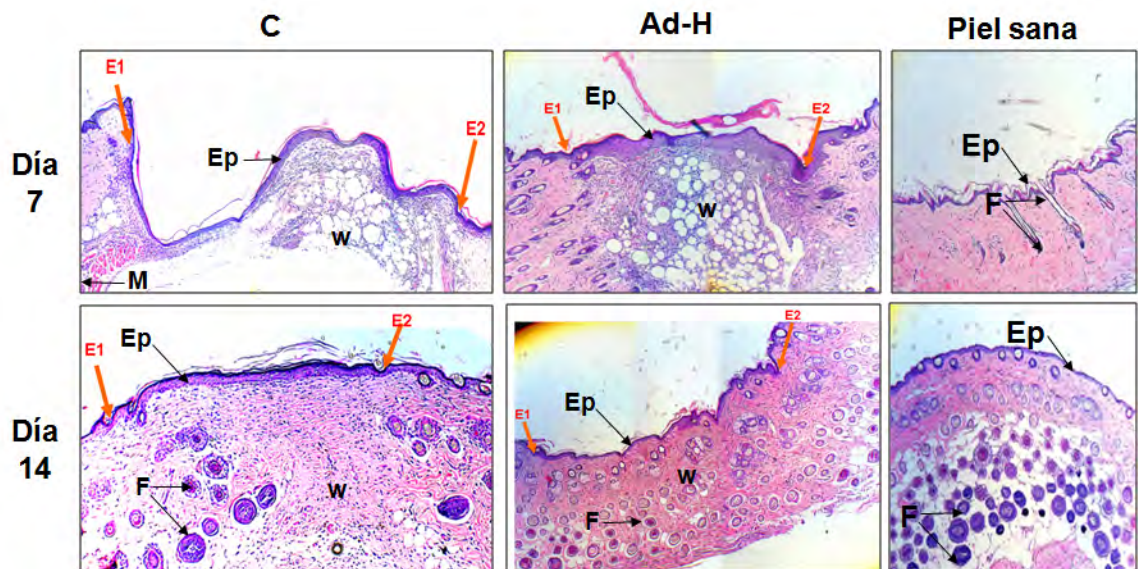


Fig. 15. Imágenes histológicas de las heridas tratadas con MC de Ad-H. (Coloración hematoxilina y eosina, 10X). Los bordes de las heridas se indican con: E1: Borde 1 de la herida; E2: Borde 2 de la herida. Se usó Ad-H. 7° y 14° día p.h.. Ep: Epidermis; M: Músculo; w: Herida; F: Folículo piloso. La muestra de piel sana de cada día corresponde a la piel adyacente del área de la herida en el mismo sujeto.

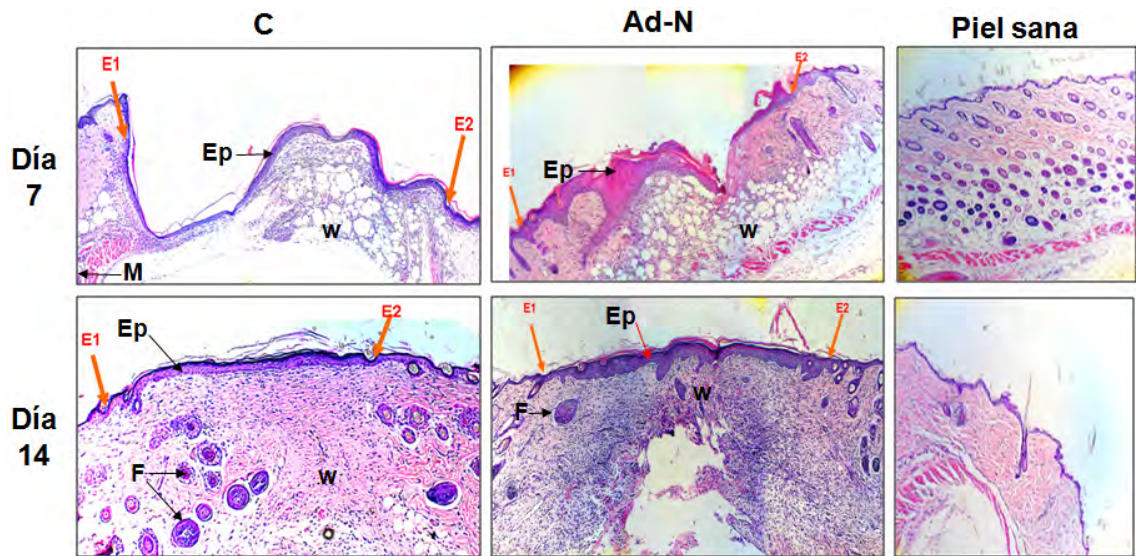


Fig. 16. Imágenes histológicas de las heridas tratadas con MC de Ad-N. (Coloración hematoxilina y eosina, 10X). Los bordes de las heridas se indican con: E1: Borde 1 de la herida; E2: Borde 2 de la herida. Se empleó Ad-N. 7 y 14 p.h. Ep: Epidermis; M: Músculo; w: Herida; F: Folículo piloso. La muestra de piel sana de cada día corresponde a la piel adyacente del área de la herida en el mismo sujeto.

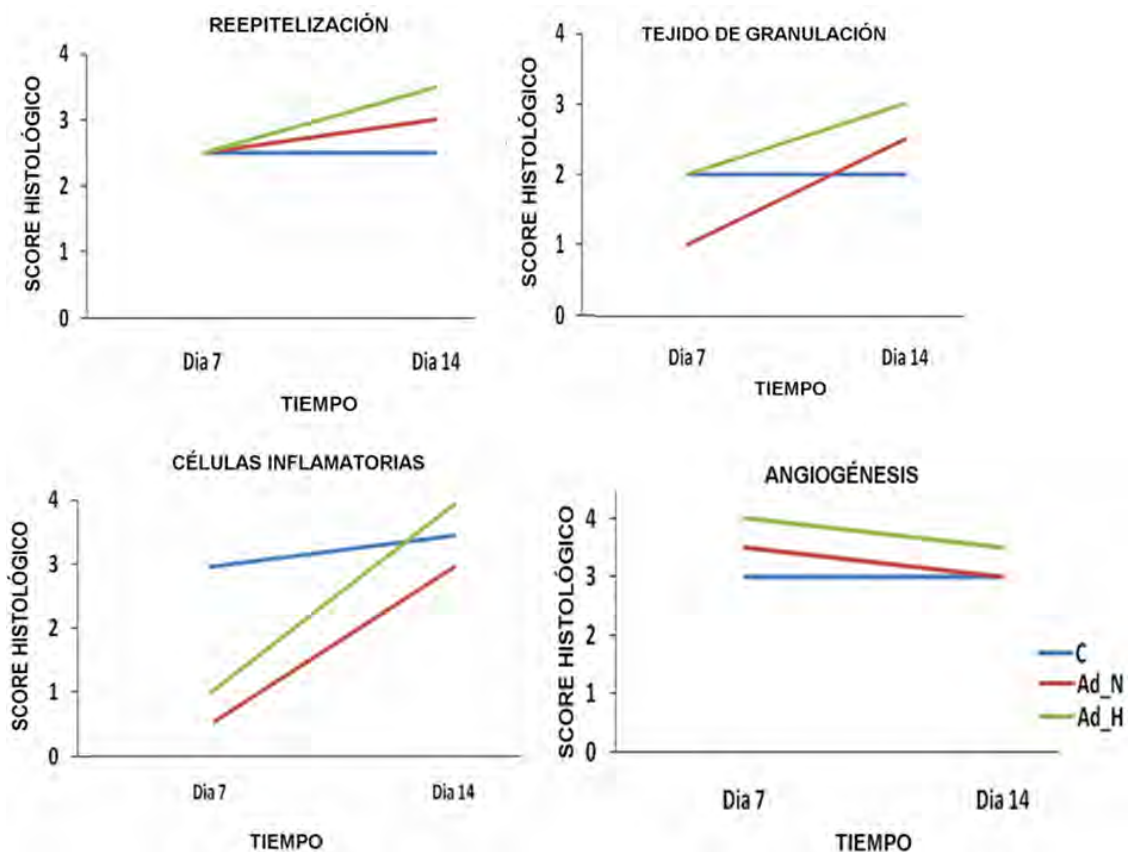
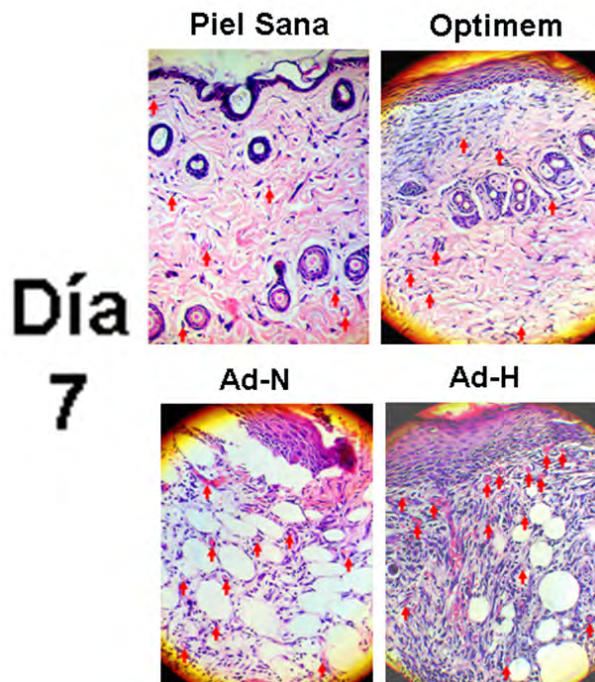
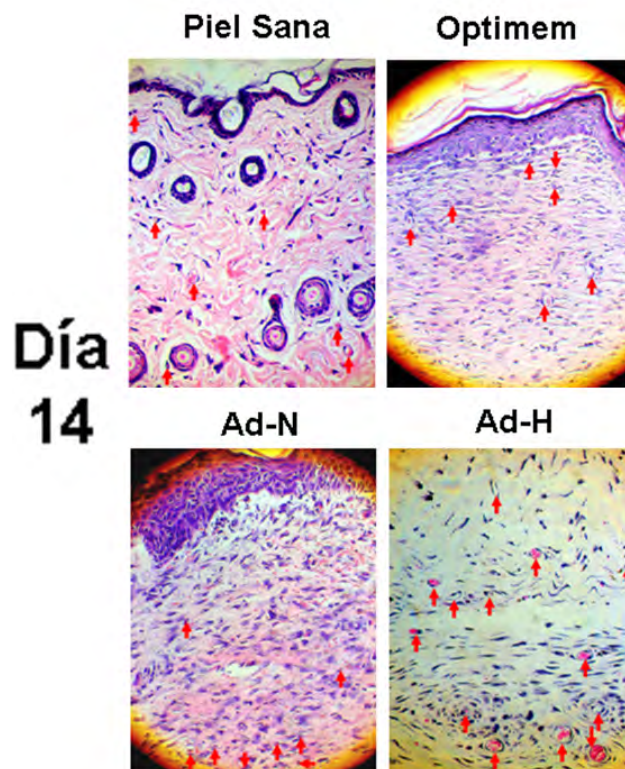


Fig. 17. Score histológico de las heridas con MC de Ad. Puntaje de cada una de las características evaluadas en el área de las heridas empleando los MC de Ad-H, Ad-N y el medio de control (C) (Optimem) al día 7° y 14° p.h. El score corresponde al promedio de las observaciones de cada histopatólogo.



*Fig. 18. Angiogénesis empleando MC de Ad al día 7. Imágenes representativas de los vasos sanguíneos nuevos (flechas) empleando los MC de Ad-H, Ad-N y el control (C) (Optimem) vs el control positivo (Piel sana de ratón) al día 7° p.h. 40X*



*Fig. 19. Angiogénesis empleando MC de Ad al día 14. Imágenes representativas de los vasos sanguíneos nuevos (flechas) empleando los MC de Ad-H, Ad-N y el control (C) (Optimem) vs el control positivo (Piel sana de ratón) al día 14° p.h. 40X*

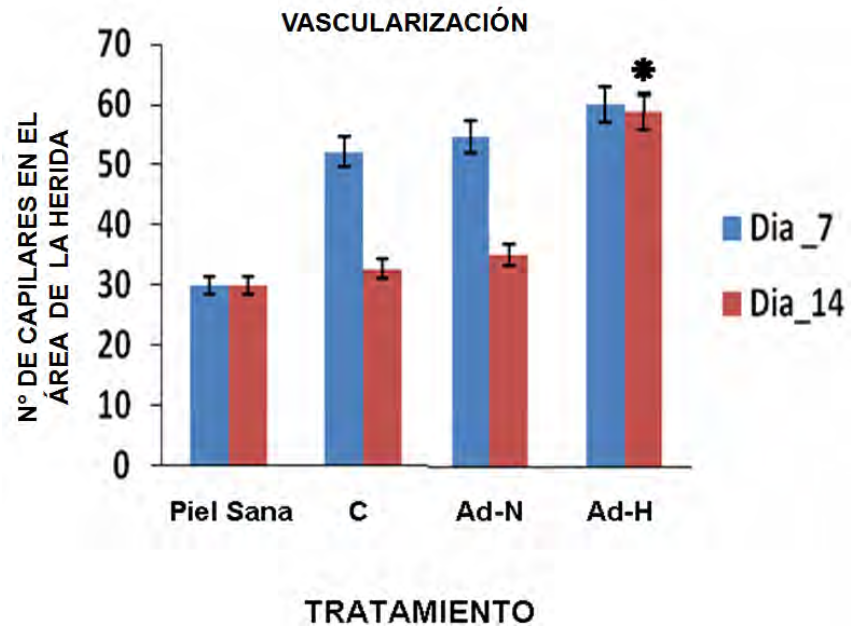


Fig. 20. Densidad capilar empleando MC de Ad. Número total de vasos sanguíneos nuevos en el área de la herida empleando los MC de Ad-H, Ad-N y el medio de control (C) (Optimem) vs el control positivo (Piel sana de ratón) al día 7° y 14° p.h. Anova \* p<0.05 comparado con HC, n=3 campos por muestra, 5 muestras por cada herida.

Tabla 15. Cambios en la reepitelización y el tejido de granulación observados el día 7 p.h. con los MC de MO.

DÍA	TRATAMIENTO		
	CONTROL	MO-H	MO-N
7	<b>REEPITELIZACIÓN</b>		
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Organización epidérmica moderada en 40-50% del tejido</li> <li>• Hiperqueratosis ortoqueratótica leve</li> <li>• Hiperplasia de leve a moderada</li> <li>• Espongiosis leve</li> <li>• Hay costras ortoqueratóticas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Organización completa en más del 80% del tejido</li> <li>• Hiperqueratosis ortoqueratótica leve</li> <li>• Hiperplasia moderada</li> <li>• Espongiosis leve</li> <li>• No hay costras</li> <li>• No hay ampollas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Organización y proliferación epitelial moderada en 60% del tejido</li> <li>• Hiperqueatosis paraqueratótica leve</li> <li>• Hiperplasia moderada</li> <li>• Espongiosis moderada</li> <li>• Costras paraqueratóticas leves a moderadas</li> <li>• No hay ampollas</li> </ul>
	<b>TEJIDO DE GRANULACIÓN</b>		
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Remodelación moderada en un 40% en sus dos capas</li> <li>• Fibroplasia moderada</li> <li>• Hemorragia moderada</li> <li>• No se presenta tejido adiposo en la dermis papilar pero si en la reticular de manera leve</li> <li>• Ausencia anexos dérmicos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Remodelación del tejido de granulación varía entre el 40-50% del tejido</li> <li>• Fibroplasia leve</li> <li>• No hay hemorragia</li> <li>• Abundante tejido adiposo en la zona de la herida</li> <li>• Ausencia de anexos dérmicos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Remodelación del tejido de granulación en el 40% del tejido</li> <li>• Fibroplasia moderada</li> <li>• No hay hemorragia</li> <li>• No hay tejido adiposo</li> <li>• Ausencia severa de anexos dérmicos</li> </ul>

Tabla 16. Cambios en el número de células inflamatorias y vasos sanguíneos el día 7 p.h. con los MC de MO.

DÍA	TRATAMIENTO		
	CONTROL	MO-H	MO-N
7	<b>CÉLULAS INFLAMATORIAS</b>		
	• Infiltrado mixto moderado a severo (7-10 células por campo)	• Infiltrado de PMN de leve a moderado (4-6 células por campo)	• Infiltrado mixto moderado (4-7 células por campo)
	<b>ANGIOGÉNESIS</b>		
	• 3-4 vasos por campo • Congestión leve a moderada • Hemorragia moderada	• 7 -10 vasos por campo • Congestión leve • Hemorragia no se aprecia	• 6-7 vasos por campo • Congestión leve • Hemorragia leve

Tabla 17. Cambios en la reepitelización y el tejido de granulación observados el día 14 p.h. con los MC de MO.

DÍA	CONTROL	MO-H	MO-N
14	<b>REEPITELIZACIÓN</b>		
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reepitelización moderada del 50%</li> <li>• Hiperqueratosis ortoqueratótica leve</li> <li>• Hiperplasia leve</li> <li>• Edema intercelular leve</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Organización y proliferación epitelial &gt; 90%</li> <li>• Hiperqueratosis ortoqueratótica leve</li> <li>• Hiperplasia leve</li> <li>• Edema intercelular leve</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• La organización y proliferación epitelial del tejido se mantiene igual</li> <li>• Hiperqueratosis ortoqueratótica leve</li> <li>• Hiperplasia leve</li> <li>• Edema intercelular leve</li> </ul>
	<b>TEJIDO DE GRANULACIÓN</b>		
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Remodelación del tejido de granulación del 40%</li> <li>• Fibroplasia moderada</li> <li>• No hay hemorragia</li> <li>• Formación leve de tejido adiposo en la capa inferior de la dermis</li> <li>• Formación de nuevos anexos dérmicos.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tejido de granulación en estado avanzado de madurez en más del 70% del tejido</li> <li>• La fibroplasia es leve</li> <li>• No hay hemorragia</li> <li>• Leve formación de tejido adiposo</li> <li>• Nuevos anexos dérmicos con diferentes grados de formación</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Se observa una maduración del tejido granulación en el 60% del tejido</li> <li>• Fibroplasia moderada</li> <li>• No hay hemorragia</li> <li>• No hay tejido adiposo</li> <li>• Ausencia de anexos dérmicos severa</li> </ul>	

Tabla 18. Cambios en el número de células inflamatorias y vasos sanguíneos el día 14 p.h. con los MC de MO.

DÍA	CONTROL	MO-H	MO-N
14	<b>CÉLULAS INFLAMATORIAS</b>		
	● Infiltrado mixto moderado a severo (7-10 células por campo)	● Infiltrado mixto leve (1-4 células por campo)	● Infiltrado mixto leve a moderado (4-7 células por campo)
	<b>ANGIOGÉNESIS</b>		
	● 3-4 vasos por campo	● 5-6 vasos por campo	● 5-6 por campo
	● Congestión leve	● No se observa congestión	● Congestión leve
	● Hemorragia moderada	● No hay hemorragia	● No hay hemorragia

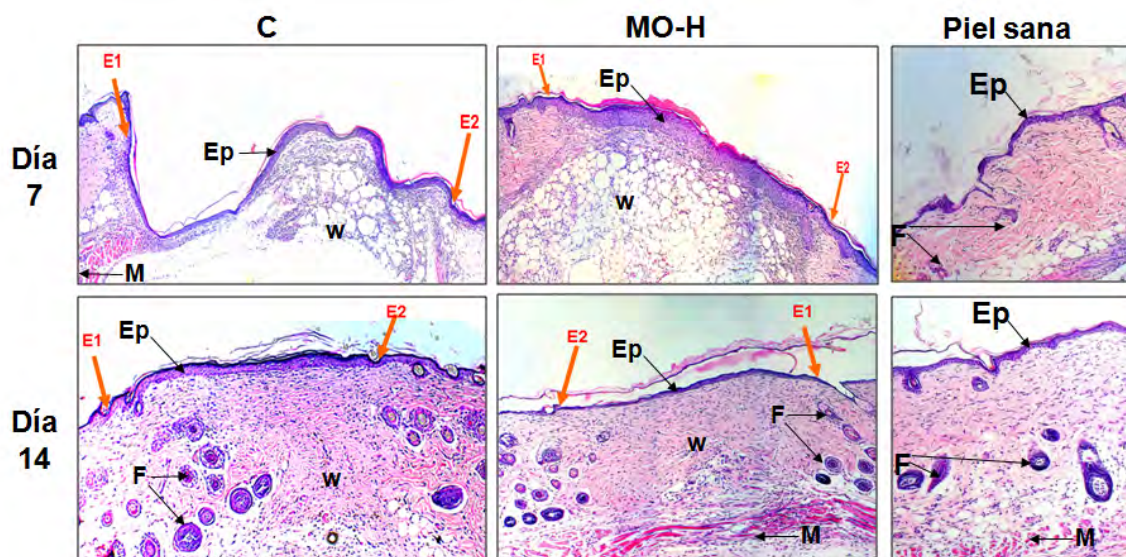


Fig. 21. Imágenes histológicas de las heridas tratadas con MC de MO-H. (Coloración hematoxilina y eosina, 10X). Los bordes de las heridas se indican con: E1: Borde 1 de la herida; E2: Borde 2 de la herida. Se usó MO-H. 7 y 14 p.h. Ep: Epidermis; M: Músculo; w: Herida; F: Folículo piloso. La muestra de piel sana de cada día corresponde a la piel adyacente del área de la herida en el mismo sujeto.

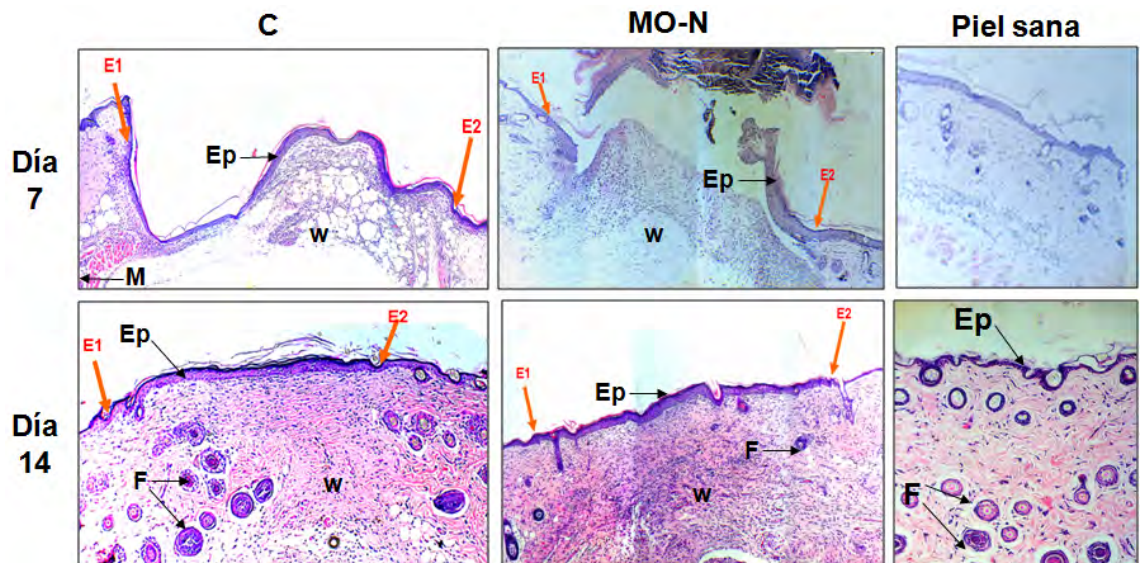


Fig. 22. Imágenes histológicas de las heridas tratadas con MC de MO-N. (Coloración hematoxilina y eosina, 10X). Los bordes de las heridas se indican con: E1: Borde 1 de la herida; E2: Borde 2 de la herida. Se empleó MO-N. 7 y 14 p.h. Ep: Epidermis; M: Músculo; w: Herida; F: Folículo piloso. La muestra de piel sana de cada día corresponde a la piel adyacente del área de la herida en el mismo sujeto.

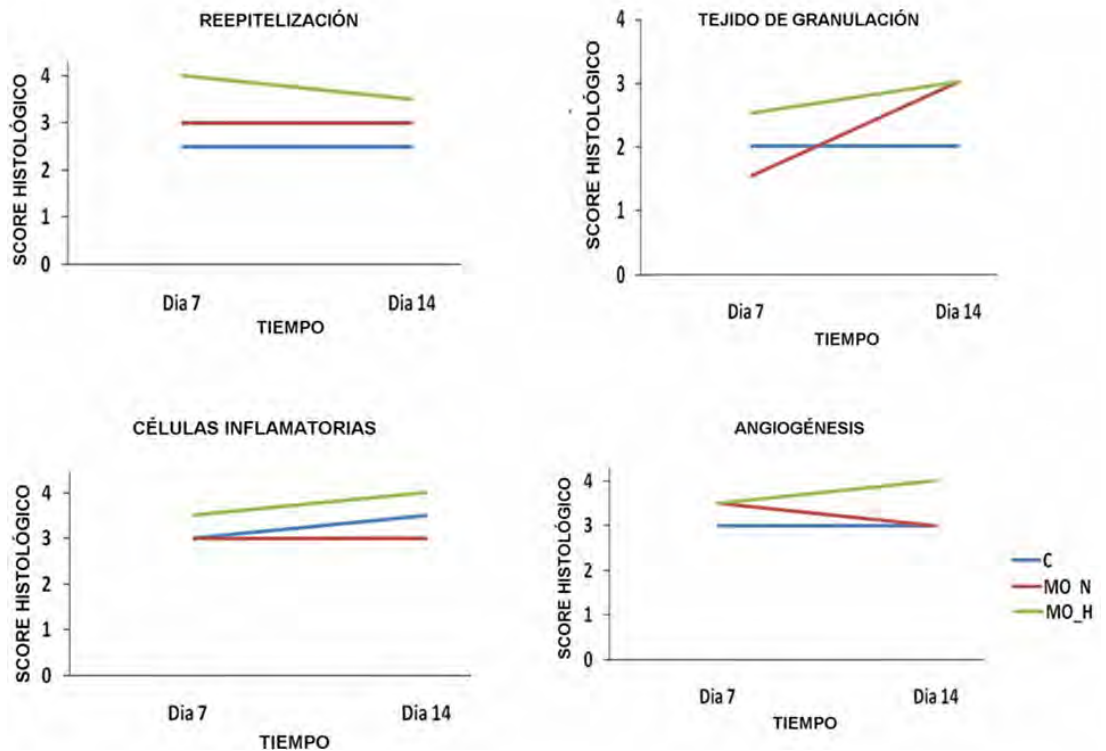
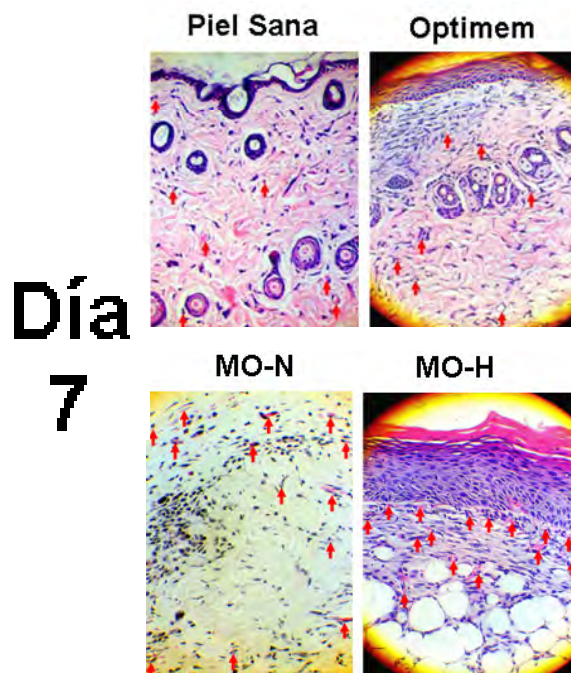
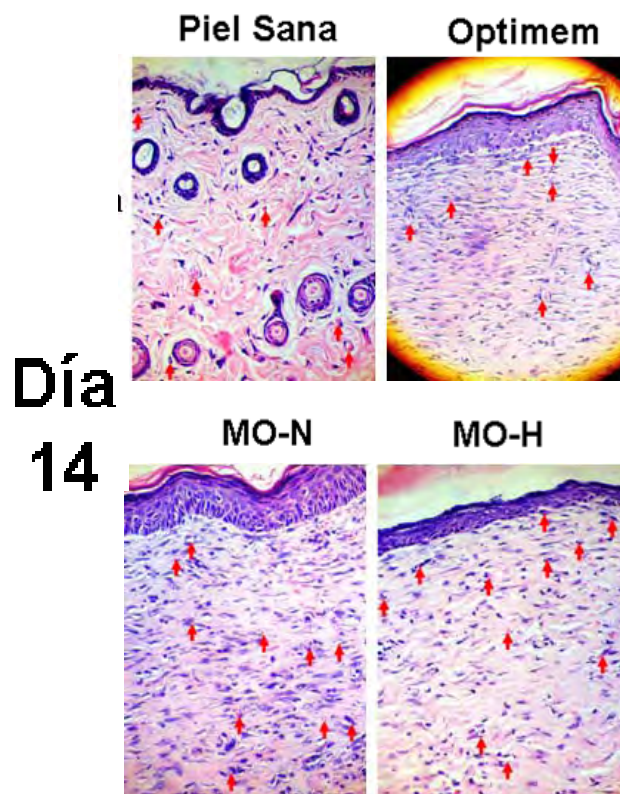


Fig. 23. Score histológico de las heridas con MC de MO. Puntaje de cada una de las características evaluadas en el área de las heridas empleando los MC de MO-H, MO-N y el medio de control (C) (Optimem) al día 7° y 14° p.h. El score corresponde al promedio de las observaciones de cada histopatólogo.



*Fig. 24. Angiogénesis empleando MC de MO al día 7. Imágenes representativas de los vasos sanguíneos nuevos (flechas) empleando los MC de MO-H, MO-N y el control (C) (Optimem) vs el control positivo (Piel sana de ratón) al día 7° p.h. 40X*



*Fig. 25. Angiogénesis empleando MC de MO al día 14. Imágenes representativas de los vasos sanguíneos nuevos (flechas) empleando los MC de MO-H, MO-N y el control (C) (Optimem) vs el control positivo (Piel sana de ratón) al día 14° p.h. 40X*

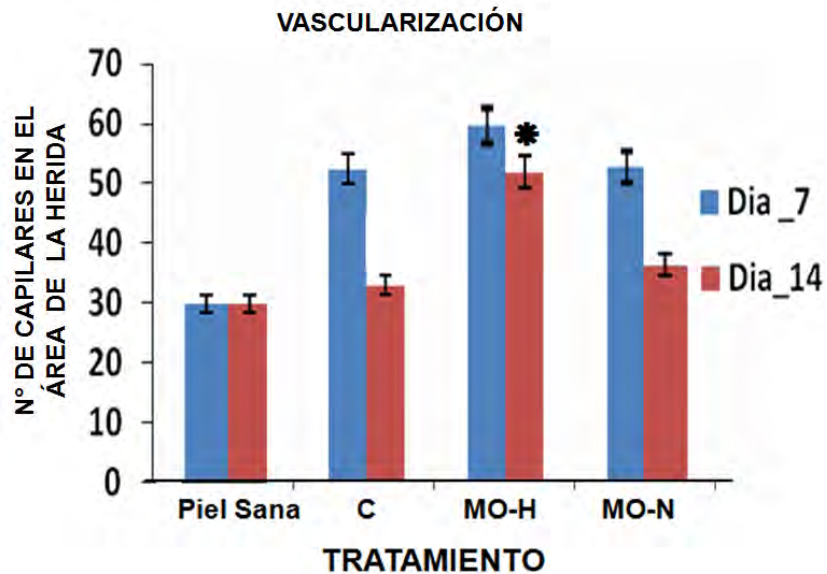


Fig. 26. Densidad capilar empleando MC de MO. Número total de vasos sanguíneos nuevos en el área de la herida empleando los MC de MO-H, MO-N y el medio de control (C) (Optimem) vs el control positivo (Piel sana de ratón) al día 7° y 14° p.h. Anova \* p<0.05 comparado con HC n=3 campos por muestra, 5 muestras por cada herida.

Tabla 19. Cambios en la reepitelización y el tejido de granulación observados el día 7 p.h. con los MC de Ad-H y MO-H.

DÍA	TRATAMIENTO		
	CONTROL	Ad-H	MO-H
7	<b>REEPITELIZACIÓN</b>		
	<ul style="list-style-type: none"> <li>Organización epidérmica moderada en un 40-50% aprox.</li> <li>Hiperqueratosis ortoqueratótica leve</li> <li>Hiperplasia de leve a moderada</li> <li>Espongiosis leve</li> <li>Hay costras ortoqueratóticas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Organización epidérmica completa en un 40-50% del tejido.</li> <li>Hiperqueratosis ortoqueratótica leve</li> <li>Hiperplasia moderada</li> <li>Edema intercelular leve</li> <li>Hay costras ortoqueratóticas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Organización completa en más del 80% del tejido</li> <li>Hiperqueratosis ortoqueratótica leve</li> <li>Hiperplasia moderada</li> <li>Espongiosis leve</li> <li>No hay costras</li> </ul>
	<b>TEJIDO DE GRANULACIÓN</b>		
	<ul style="list-style-type: none"> <li>Remodelación moderada en un 40% en sus dos capas</li> <li>Fibroplasia moderada</li> <li>Hemorragia moderada</li> <li>No hay tejido adiposo en dermis papilar pero si en la reticular de manera leve</li> <li>Ausencia de anexos dérmicos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Remodelación moderada en el 40% del tejido de granulación</li> <li>Fibroplasia moderada</li> <li>Hemorragia leve</li> <li>Evidente aumento de adipocitos</li> <li>Ausencia total de anexos dérmicos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Remodelación moderada del tejido de granulación del 40-50% del tejido</li> <li>Fibroplasia leve</li> <li>No hay hemorragia</li> <li>Abundante tejido adiposo</li> <li>Ausencia de anexos dérmicos</li> </ul>

Tabla 20. Cambios en el número de células inflamatorias y vasos sanguíneos el día 7 p.h. con los MC de Ad-H y MO-H.

DÍA	TRATAMIENTO		
	CONTROL	Ad-H	MO-H
7	<b>CÉLULAS INFLAMATORIAS</b>		
	• Infiltrado mixto moderado a severo (7-10 células por campo)	• Infiltrado de células PMN severo (10-13 células por campo)	• Infiltrado de PMN de leve a moderado (4-6 células por campo)
	<b>ANGIOGÉNESIS</b>		
	• 3-4 vasos por campo	• Más de 7 vasos por campo	• 7-10 vasos por campo
	• Congestión leve a moderada	• Congestión leve	• Congestión leve
	• Hemorragia moderada	• Hemorragia leve	• No hay hemorragia

Tabla 21. Cambios en la reepitelización y el tejido de granulación observados el día 14 p.h. con los MC de Ad-H y MO-H.

DÍA	TRATAMIENTO		
	CONTROL	Ad-H	MO-H
14	<b>REEPITELIZACIÓN</b>		
	• Reepitelización moderada del 50%	• La estructura de la piel y proliferación epitelial fue igual o superior al 90% del tejido.	• Organización y proliferación epitelial superior al 90%
	• Hiperqueratosis ortoqueratótica leve	• Hiperqueratosis ortoqueratótica sigue igual	• Hiperqueratosis leve
	• Hiperplasia leve	• Hiperplasia leve	• Hiperplasia leve
	• Edema intercelular leve	• Edema intercelular leve	• Edema intercelular leve
<b>TEJIDO DE GRANULACIÓN</b>			
	• Remodelación del tejido de granulación del 40%	• Maduración y remodelación del colágeno en más del 70% del tejido de granulación	• Tejido de granulación en estado avanzado de madurez en más del 70% del tejido
	• Fibroplasia moderada	• Fibroplasia leve	• Fibroplasia leve
	• No hay hemorragia	• No hay hemorragia	• No hay hemorragia
	• Formación leve de tejido adiposo en la capa inferior de la dermis	• Formación de tejido adiposo	• Leve formación de tejido adiposo
	• Nuevos anexos dérmicos.	• Nuevos anexos dérmicos	• Nuevos anexos dérmicos con diferentes grados de formación

Tabla 22. Cambios en el número de células inflamatorias y vasos sanguíneos el día 14 p.h. con los MC de Ad-H y MO-H.

DÍA	TRATAMIENTO		
	CONTROL	Ad-H	MO-H
	<b>CÉLULAS INFLAMATORIAS</b>		
	• Infiltrado mixto moderado a severo (7-10 células por campo)	• Infiltrado mixto leve (1-4 células por campo)	• Infiltrado mixto leve (1-4 células por campo)
	<b>ANGIOGÉNESIS</b>		
14	• 3-4 vasos por campo • Congestión leve • Hemorragia moderada	• 5-6 vasos por campo • No hay congestión • No hay hemorragia	• 5-6 vasos por campo • No se observa congestión • No hay hemorragia

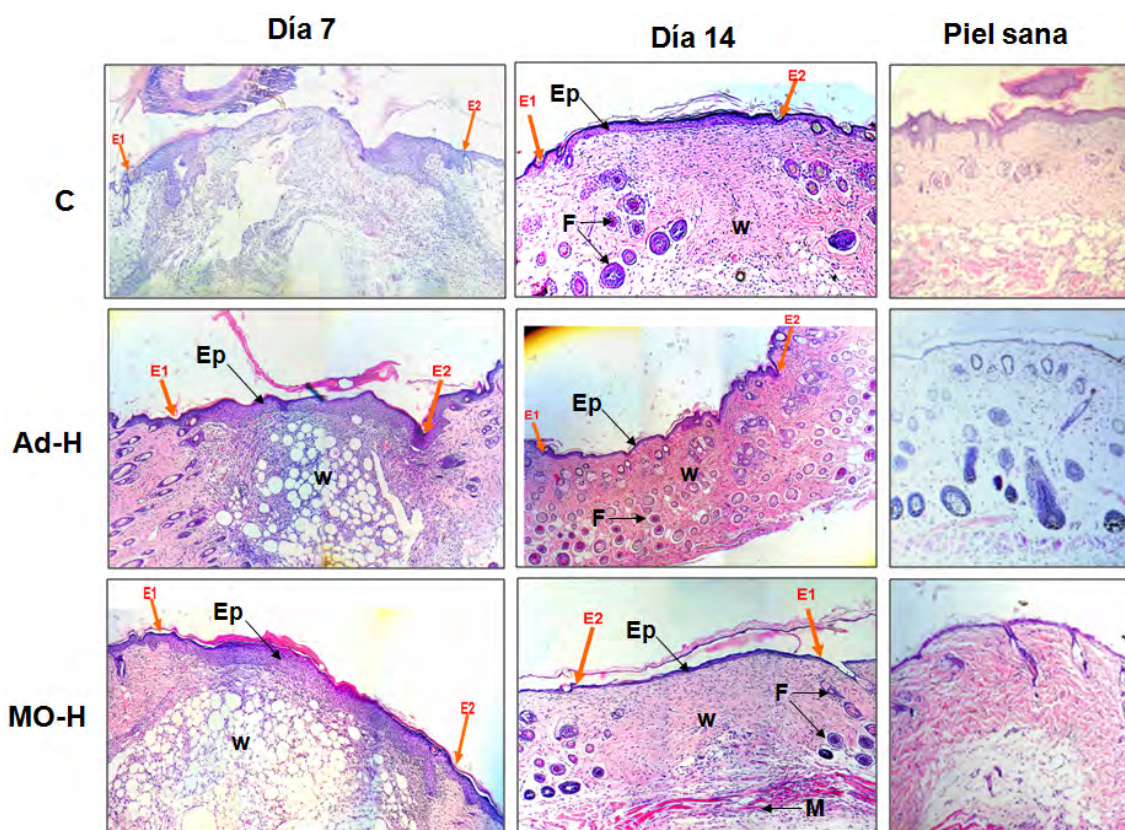


Fig. 27. Imágenes histológicas de las heridas tratadas con MC de Ad-H y MO-H. (Coloración hematoxilina y eosina, 10X). Los bordes de las heridas se indican con: E1: Borde 1 de la herida; E2: Borde 2 de la herida. Se emplearon Ad-H y MO-H. 7 y 14 p.h. Ep: Epidermis; M: Músculo; w: Herida; F: Folículo piloso. La muestra de piel sana de cada día corresponde a la piel adyacente del área de la herida en el mismo sujeto.

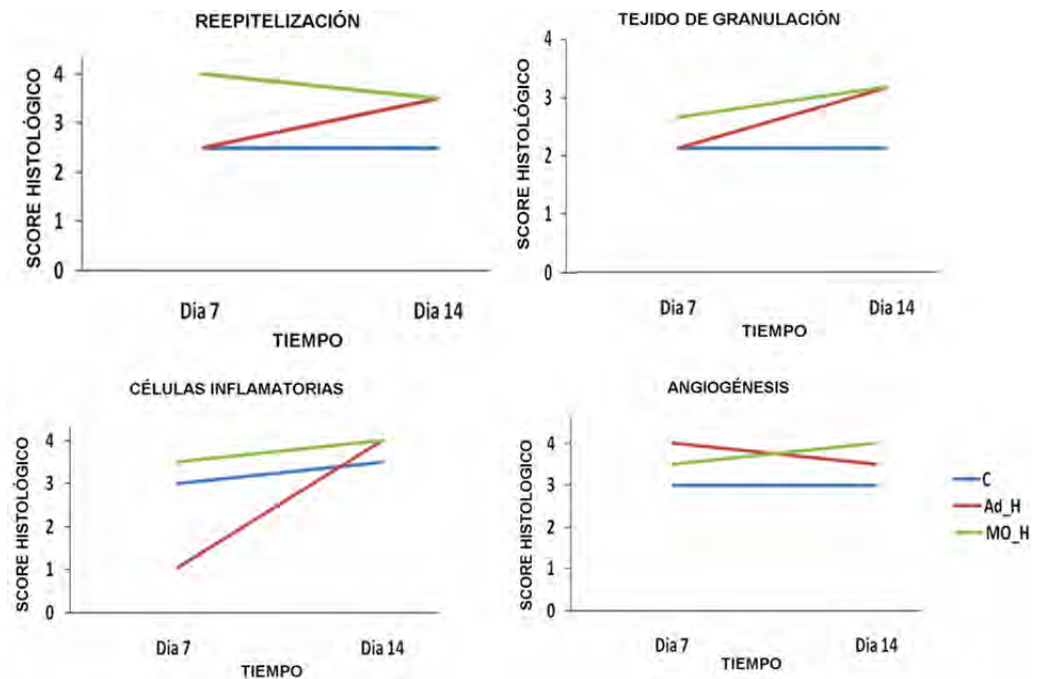


Fig. 28. Score histológico de las heridas con MC de MO-H y Ad-H. Puntaje de cada una de las características evaluadas en el área de las heridas empleando los MC de MO-H, MO-N y el medio de control (C) (Optimem) al día 7° y 14° p.h. El score corresponde al promedio de las observaciones de cada histopatólogo.

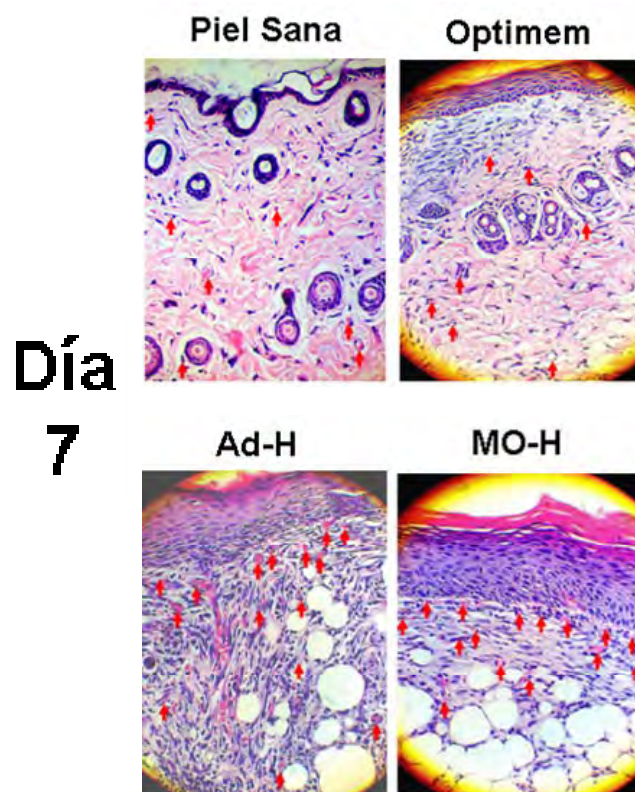
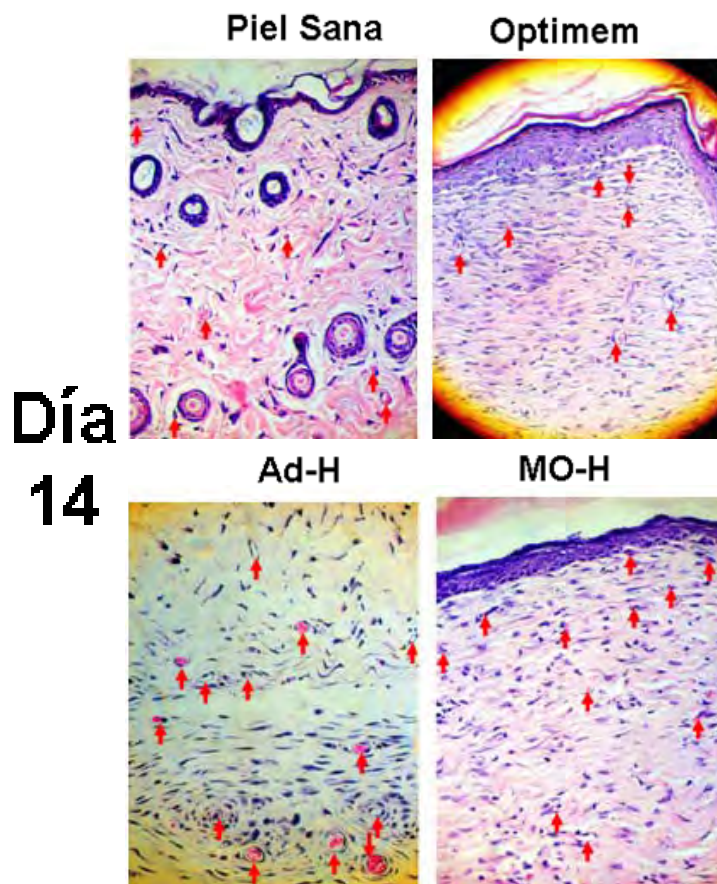
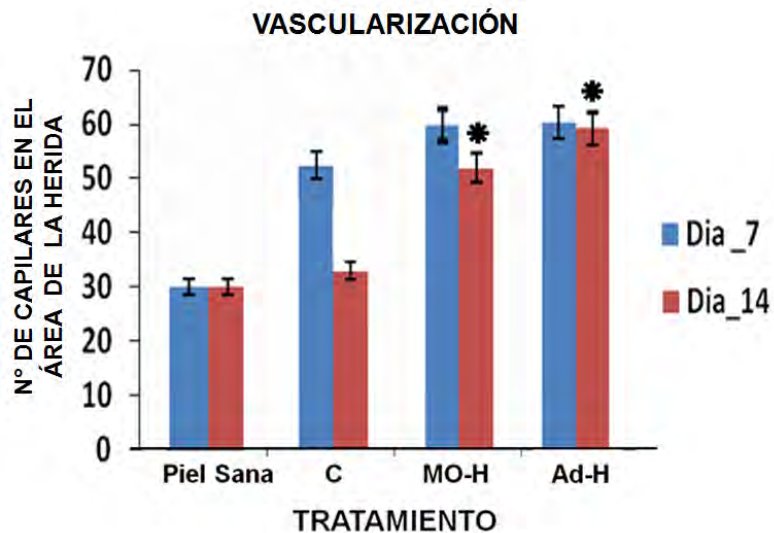


Fig. 29. Angiogénesis empleando MC de Ad-H y MO-H al día 7. Imágenes representativas de los vasos sanguíneos nuevos (flechas) empleando los MC de Ad-H, MO-H y el control (C) (Optimem) vs el control positivo (Piel sana de ratón) al día 7° p.h. 40X



*Fig. 30. Angiogénesis empleando MC de Ad-H y MO-H al día 14. Imágenes representativas de los vasos sanguíneos nuevos (flechas) empleando los MC de Ad-H, MO-H y el control (C) (Optimem) vs el control positivo (Piel sana de ratón) al día 14° p.h. 40X*



*Fig. 31. Densidad capilar empleando MC de Ad-H y MO-H. Número total de vasos sanguíneos nuevos en el área de la herida empleando MC de Ad-H, MO-H y el medio de control (C) (Optimem) vs el control positivo (Piel sana de ratón) al día 7° y 14° p.h. Anova \*  $p < 0.05$  comparado con HC.  $n = 3$  campos por muestra, 5 muestras por cada herida.*

## 7. DISCUSIÓN

### 7.1. CIERRE DE LA HERIDA

Los MC empleados en este trabajo fueron obtenidos tanto en condiciones de normoxia (21% de O<sub>2</sub>) como de hipoxia (2% O<sub>2</sub>), y posteriormente analizados mediante cuantificación de proteínas totales (Bio-Rad Assay kit 1) y arreglo de anticuerpos para la cuantificación relativa de proteínas (RayBio Human Angiogenesis Antibody Array C series 1000), actividades previas al desarrollo de este trabajo, cuyos resultados mostraron la presencia de diferentes factores proangiogénicos, además de citoquinas, quimoquinas y otras biomoléculas de importancia biológica como enzimas y receptores secretadas por MSC tanto de MO como Ad.

En el caso de los MC de MO, obtenidos en condiciones de normoxia, dichos resultados mostraron mayores cantidades de citoquinas como IL-4 e inhibidores tisulares de metaloproteinasas TIMP-1 y TIMP-2, además de otros 35 factores entre los que se destacan bFGF, IFN $\gamma$ , IL-8, PDGF-BB, TGF- $\beta$ , TIMP-1, TIMP-2, Trombopoyetina, VEGF y VEGF-D, Ang-2, angiostatina, IL-4, MMP-1, MMP-9, PECAM, TNF- $\alpha$ , VEGFR2, VEGF-R3. En cambio, estos medios, al ser sometidos a hipoxia, se encontró que dichos factores aumentaron entre 2 -14 veces comparado con los MC obtenidos en normoxia (Restrepo SX, 2008).

Respecto a los MC de Ad, obtenidos en condiciones de normoxia, se encontró que contenían 34 FC, con diferentes niveles de intensidad de secreción, entre los que se destacan angiogenina, EGF, bFGF, IL-8, trombopoyetina, VEGF, VEGF-D, VEGFR2, TIMP-1, TIMP-2 y MMP-1 entre otros. Por el contrario, los MC al someterse a condiciones de hipoxia, aumentaron tanto la cantidad de FC como su secreción, entre 2 – 47 veces, en dichos medios, destacándose un mayor incremento de endostatina, IL-1 $\beta$ , Ang-1, Ang-2, G-CSF, IL-2, MCP-3, MCP-4, Tie-2 y TNF- $\alpha$  entre otros (Restrepo SX, 2008).

Al producirse una discontinuidad de la piel, se inicia una serie de eventos conducentes a la reparación de la misma como es la proliferación y migración celular, eventos que se aceleran por la hipoxia producida por la misma lesión que atrae a dicha área a queratinocitos, fibroblastos así como a células endoteliales, además de células inflamatorias y células madre residentes en los tejidos adyacentes. También es conocido que FC como EGF, PDGF, bFGF, VEGF son vitales para el reclutamiento y conservación de las células mencionadas así como para la formación de nuevos vasos sanguíneos en el territorio lesionado que permitirán la supervivencia tanto de las células del tejido de granulación como de queratinocitos.

Al replicar en laboratorio las condiciones de hipoxia de una célula como las MSC de MO o de Ad, estas células incrementan, de manera notable, la secreción de FC que mejoran la curación de la herida. Estos FC pueden pasar a los medios de cultivo, condicionándolos de esta manera, y ejercer efectos similares cuando son inyectados, a los que se logran cuando se implantan directamente las MSC en las heridas.

En este estudio, con la aplicación de los MC de MO, se puede observar que la dinámica del cierre de las heridas se acelera respecto a las heridas control, puesto que a los 4 días p.h. estas heridas tienen porcentajes de cierre superiores al 40% (48.0% con MO-H y 42.0% con MO-N) mientras que las herida control

alcanza el 36.2% del cierre. Esta dinámica se acelera entre el 4 y el 7° día p.h., al alcanzar las heridas tratadas con los MC porcentajes de cierre superiores al 80% (93.8% con MO-H y 80% con MO-N), en tanto que con Optimem el cierre logra solo 57.5%. Para el día 10 p.h., las heridas tratadas con MO-H se encuentran cerradas en su mayoría; a las que se les aplicó el MO-N el cierre está próximo a completarse (94.3%) en tanto que con el control el cierre alcanza el 81.9%. Al finalizar el experimento en el día 14 p.h., las heridas inyectadas con los MC se encuentran, en su mayoría, cerradas y las heridas tratadas con Optimem finalizaron con un cierre de 89.5%.

Con el empleo de los MC de Ad, se puede apreciar que al día 4 p.h. existen diferencias estadísticamente significativas entre los promedios de cierre de las heridas tratadas con estos MC ya que éstas presentan cierres superiores al 33% (40% con Ad-H y 33.4% con Ad-N), frente a un 20.9% de las heridas tratadas con Optimem. Para el día 7° p.h. también se notan diferencias significativas puesto que las heridas tratadas con los MC muestran cierres superiores al 50% (67.2% con Ad-H y 51.2% con Ad-N) frente a un 38.2% de las heridas tratadas con Optimem. Al día 10 p.h., las heridas tratadas con los MC presentan cierres superiores al 85% (85.3% con Ad-H y 87.7% con Ad-N), las heridas control alcanzan un 69.4% de cierre; para el día final del experimento, todas las heridas han cerrado.

Estos resultados sugieren que los FC contenidos en estos MC ejercen su efecto sobre las células responsables de la reparación de la herida mediante mecanismos paracrinos, resultados similares a los reportados por Kim WS et al (2007), Chen et al (2008) y Lee et al (2009), donde se muestran los efectos de MC tanto de MO como de Ad en la curación de heridas y también apoyan la idea que este tipo de mecanismo es el responsable del mejoramiento en el cierre de las heridas, y no la diferenciación a otros linajes celulares, lo que permite justificar el uso de los MC en un futuro cercano de los MC como opción terapéutica en el tratamiento heridas crónicas.

## **7.2. ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO**

La curación de una herida, en este caso heridas de espesor total, involucra de forma importante fenómenos como la migración celular, tanto de queratinocitos, fibroblastos como de células endoteliales; procesos inflamatorios; síntesis provisional de una nueva matriz extracelular y deposición de colágeno. Este efecto migratorio, así como los otros mecanismos involucrados en la reparación tisular, se ven estimulados tanto por la hipoxia generada por la lesión como por la acción sinérgica de múltiples FC, como PDGF, bFGF y VEGF, que son decisivos para que estas células sobrevivan y proliferen adecuadamente.

Para el caso de esta investigación, las evaluaciones histológicas hechas por histopatólogos veterinarios permiten sugerir que la dinámica y calidad del proceso de curación mejoró significativamente en las heridas luego de la aplicación de los MC, tanto de MO como Ad, respecto al medio control manifestándose dicha mejoría en una reepitelización más rápida, estimulación y proliferación de fibroblastos y, por lo tanto, formación del tejido de granulación donde se llevará a cabo uno de los procesos centrales de la reparación de la herida como lo es la formación de nuevos vasos sanguíneos, fenómeno que asegurará el suplemento y la adecuada entrega de oxígeno y nutrientes a los tejidos en reparación. Estos efectos se incrementaron de manera más notoria con el empleo de los MC obtenidos en hipoxia que los obtenidos en normoxia.

En este orden de ideas, al finalizar el experimento al día 14, las heridas que recibieron la aplicación de los MC obtenidos en hipoxia, presentaron, en general, una evolución más favorable durante el proceso de curación por cuanto su estructura histológica, tanto en su epidermis como en su dermis, es más parecida a la estructura normal de la piel, situación diferente cuando se emplearon los MC obtenidos en normoxia o con el medio control, como se puede observar en las figuras 15-31.

El proceso inflamatorio que presentaron las heridas disminuyó de manera importante con el empleo de los MC respecto a la herida control, situación que aceleró el proceso de cicatrización y, por consiguiente, el cierre de la herida, fenómeno que pudo haberse presentado por la presencia de citoquinas antiinflamatorias y proinflamatorias presente en los MC y las cuales pudieron haber ejercido dicho efecto, el cual se incrementa con el uso de los MC obtenidos en hipoxia.

En este estudio, se puede apreciar como con el empleo de los MC, obtenidos en condiciones de hipoxia y normoxia, las heridas en los primeros 7 días presentan una mayor cantidad de vasos sanguíneos que las heridas control, pero este efecto se observa en mayor proporción con los MC obtenidos en hipoxia, permitiendo que las heridas puedan curar más rápido, resultados que concuerdan con los obtenidos por Wu Y et al (2007) y Chen L et al (2008). Dicho número de capilares disminuye a medida que la herida evoluciona, al ocurrir un remodelamiento del tejido de granulación y de las fibras colágenas, se produce apoptosis de los vasos recién formados ya sea por estrangulamiento de las fibras colágenas durante su fase de maduración o por la acción de trombospondina 1 y 2, angiostatina, endostatina y angiopoyetina 2 (Singer AJ y Clark RA, 1999), situación que permite que el número de vasos sanguíneos en el área de la herida sea similar al de la piel sana. Con la aplicación de los MC obtenidos bajo condiciones de hipoxia, se observa que el número de vasos sanguíneos no disminuye en la misma proporción como cuando se emplean los MC obtenidos en normoxia o con el medio control, situación que se puede ver en las figuras 18, 19, 24, 25, 29, 30.

Los efectos anteriores, según los resultados de estudios previos como los de Chen L et al (2008), Wu Y et al (2007) y Fu X et al (2007) así como de los análisis previos de los MC empleados en este trabajo, se pueden deber a la acción paracrina de los FC secretados por MSC en niveles altos, tanto de MO como de Ad, y que dichos FC, como PDGF, TGF- $\beta$ , VEGF, etc., no trabajan aisladamente sino en interacción con otras proteínas regulatorias de manera coordinada, para estimular y mejorar los dos eventos mayores que conducen a la reparación de la piel en caso de heridas: la angiogénesis y la regulación de la formación de nueva matriz, además de la reepitelización lo que puede convertir a los MC en una prometedora terapia para mejorar la reparación de tejidos lesionados.

## CONCLUSIONES

1. Con el uso de los MC de MSC tanto de MO como de Ad, especialmente los obtenidos en condiciones de hipoxia, si existe mejoría en el proceso de cicatrización de heridas en la piel de ratones que se asocia principalmente con:
  - El cierre acelerado de las heridas
  - El aumento del número de capilares en el tejido de granulación
  - La baja presencia de células inflamatorias en la herida
2. Los MC empleados en esta investigación, en cada uno de los grupos experimentales, tienen un efecto benéfico al acelerar la dinámica del cierre de las heridas lo que los puede constituir en una futura opción terapéutica para el tratamiento de heridas crónicas como úlceras por presión o úlceras de pie diabético.
3. La formación de nuevos vasos sanguíneos y su persistencia luego de los procesos de remodelación y maduración del tejido de granulación de las heridas se incrementa con la utilización de los MC, particularmente los obtenidos en hipoxia, siendo estos resultados concordantes con resultados previos obtenidos por otros grupos de investigación.
4. La estructura histológica de la piel, al finalizar los experimentos, se asemejó más a la piel normal con el empleo de los MC, concretamente los de MO y Ad en hipoxia.
5. Los resultados obtenidos no mostraron una diferencia estadísticamente significativa en cuanto al uso de los MC de MO-H y Ad-H, lo que permite sugerir que ambos MC son igualmente efectivos en el tratamiento de heridas, pero dadas las facilidades de obtención de células de tejido adiposo es aconsejable el empleo de los MC de Ad aunque sin descartar la posibilidad de emplear el otro MC.
6. En el futuro, la combinación de los MC con otros agentes y vehículos farmacológicos que faciliten su aplicación y dosificación, pueden convertir a los MC en una terapia de "botiquín" de fácil acceso a la población que presente heridas de difícil cicatrización.

## RECOMENDACIONES

Los resultados obtenidos en esta investigación abren la puerta a otras posibles investigaciones como:

1. Con base en los resultados obtenidos en este trabajo y apoyados en el amplio cuerpo de evidencias existentes referentes a los MC como opción terapéutica, se podría plantear, en los próximos años, el inicio de un estudio clínico interdisciplinario con pacientes que presenten heridas crónicas.
2. Realizar este mismo estudio en diferentes modelos animales, por ejemplo, un modelo porcino, donde se puedan extrapolar los beneficios de los MC en diferentes estudios clínicos veterinarios.
3. Evaluar el efecto de estos MC en un modelo donde se evidencie el efecto de diferentes dosis para obtener una posible dosis adecuada de aplicación en próximos estudios clínicos humanos.
4. Estudiar de manera más detallada el efecto de los FC que contiene los MC estudiados y que participan en los procesos de proliferación, angiogénesis y remodelación que se lleva a cabo durante la cicatrización de las heridas con el fin de preparar MC que permitan el tratamiento de patologías específicas donde se han alterado de forma notoria estos procesos.
5. Evaluar el comportamiento de los MC con diferentes vehículos farmacológicos así como con otros complementos biológicos que ayuden a potenciar el efecto benéfico de los MC y que se puedan convertir en un tratamiento económico y de fácil acceso para pacientes con heridas crónicas.

## BIBLIOGRAFÍA

Abdollahi, Hamid; Harris, Lisa J.; Zhang, Ping; McIlhenny, Stephen; Srinivas, Vikram; Tulenko, Thomas; DiMuzio, Paul J.. The Role of Hypoxia in Stem Cell Differentiation and Therapeutics. Article in press. Journal of Surgical Research -, 1–6 (2010)

Aejaz, H.M.; Aleem, A.K.; Parveen, N.; Khaja, M.N.; Lakshmi Narasu, M.; Habibullah, C.M. Stem Cell Therapy—Present Status. Transplantation Proceedings, 39, 694–699 (2007)

Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. Blood 2005;105(4):1815–22.

Akita, Sadanori; Akino, Kozo; Hirano, Akiyoshi; Ohtsuru, Akira; Yamashita, Shunichi. Reconstruction for local radiation injuries and proposed regeneration therapy for acute systemic radiation injuries. International Congress Series 1299 (2007) 196–202

Altavilla D, Galeano M, Bitto A, Minutoli L, Squadrito G, Seminara P, Venuti F S, Torre V, Calò M, Colonna M, Lo Cascio P, Giugliano G, Scuderi N, Mioni C, Leone S, Squadrito F. Lipid peroxidation inhibition by raxofelast improves angiogenesis and wound healing in experimental burn wounds. Shock 2005; 24:85–91

Arosarena, Oneida. Tissue engineering. Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg 13:233–241. <sup>a</sup> 2005 Lippincott Williams & Wilkins

Atiyeh, Bishara S; Hayek Shady N.; Gunn, S. William. New technologies for burn wound closure and healing- Review of the literatura. Burns 31 (2005) 944–956

Badiavas, Evangelos V; Falanga, Vincent. Treatment of chronic wounds with Bone Marrow-Derived Cells. Arch Dermatol. 2003; 139:510-516

Baksh, D.; Song , L.R.; Tuan, S. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. J. Cell. Mol. Med. Vol 8, No 3, 2004 pp. 301-316

Bannasch H, Fohn M, Unterberg T, et al. Skin tissue engeneering. Clin Plast Surg 2003;30:573–9.

Barroetabeña Reyes, Ana del Rosario, Sánchez Anta, Alejandro, Guerra Miranda Juan. Acción del aceite ozonizado sobre el proceso inflamatorio en heridas de piel de animales de experimentación. Correo Científico Médico de Holguín 2002;6(2)

Beltrán Casas, Orieta; Quintero, Lida Osmarla; Chaparro, Orlando. Plasticidad y Transdiferenciación en Células “Stem” Adultas – Revisión. Revista Med 13(1): 10-16, 2005

\_\_\_\_\_. Expresión de factores angiogénicos en células madre mesenquimales humanas derivadas de tejido adiposo, en condiciones de normoxia e hipoxia. Bogotá D.C, 2007, 101 p. Tesis de Grado (Maestría en Genética Humana) Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Medicina. Departamento de Morfología.

Biancho P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. Stem Cells 2001;19(3):180–92.

- Bjarnsholt, Thomas; Kirketerp-Møller, Klaus; Østrup Jensen, Peter; Madsen, Kit G; Phipps, Richard; Krogfelt, Karen; Høiby, Niels; Givskov, Michael. Why chronic wounds will not heal: a novel hypothesis. *Wound Rep Reg* (2008) 16 2–10
- Bobis, Sylwia; Jarocho, Danuta; Majka, Marcin. Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. *Folia Histochemica Et Cytobiologica*. Vol. 44, No. 4, 2006. pp. 215-230
- Bongso, Ariff; Richards, Mark. History and perspective of stem cell research. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology*. Vol. 18, No. 6, pp. 827–842, 2004
- Braye F, Pascal P, Bertin-Maghit M, et al. Advantages of using a bank of allogenic keratinocytes for the rapid coverage of extensive and deep second degree burns. *Med Biol Eng Comput* 2000;38: 248–52.
- Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem* 2006;98(5):1076–84.
- Cha, Jisun; Falanga, Vincent. Stem cells in cutaneous wound healing. *Clinics in Dermatology*(2007) 25, 73–78
- Chaparro Garzón, Orlando. Expresión de factores angiogénicos en células madre mesenquimales humanas derivadas de tejido adiposo, en condiciones de normoxia e hipoxia. Universidad Nacional de Colombia, Facultad De Medicina, Departamento de Ciencias Fisiológicas, 2006. Proyecto presentado al BanRepública.
- Chen, Liwen; Tredget, Edward E.; Wu, Philip Y. G.; Wu, Yaojiong. (2008). Paracrine Factors of Mesenchymal Stem Cells Recruit Macrophages and Endothelial Lineage Cells and Enhance Wound Healing. *PLoS ONE* 3(4): e1886. doi:10.1371/journal.pone.0001886
- Chen, Ye; Shao, Jian-Zhong; Xiang, Li-Xin; Dong, Xue-Jun, Zhang, Guo-Rong. Mesenchymal stem cells: A promising candidate in regenerative medicine. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 40 (2008) 815–820
- Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, Giunti D, Cappiello V, Cazzanti F, et al. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood* 2006; 107(1):367–72.
- Csete, Marie. Oxygen in the Cultivation of Stem Cells. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1049: 1–8 (2005).
- Da Silva Meirelles, L., Chagastelles, P. C., & Nardi, N. B. (2006). Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J. Cell. Sci.*, 119, 2204–2213.
- \_\_\_\_\_, Caplan, Arnold I. Nardi, Nance Beyer. In Search of the In Vivo Identity of Mesenchymal Stem Cells. *STEM CELLS* 2008;26(9): 2287–2299
- \_\_\_\_\_, Fontes, Aparecida Maria; Covas, Dimas Tadeo; Caplan, Arnold I. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 20 (2009) 419–427
- \_\_\_\_\_, Nardi NB. Methodology, biology and clinical applications of mesenchymal stem cells. *Front Biosci* 2009;14:4281–98.
- Daniel, Thomas O and Abrahamson, Dale. Endothelial Signal Integration In Vascular Assembly. *Annu. Rev. Physiol.* 2000. 62:649–71

Davis, Thomas A, Black, Alfred T, Kidwell, William R, Lee, Kelvin P. Conditioned Medium From Primary Porcine Endothelial Cells Alone Promotes The Growth Of Primitive Human Haematopoietic Progenitor Cells With A High Replating Potential: Evidence For A Novel Early Haematopoietic Activity. *CYTOKINE*, Vol 9, No 4 (April), 1997: pp 263-275

Dazzi, Francesco; Ramasamy, Rajesh; Glennie, Sarah; Jones, Simon P.; Roberts, Irene. The role of mesenchymal stem cells in haemopoiesis. *Blood Reviews* (2006) 20, 161–171

De Ugarte DA, Morizono K, Elbarbary A et al. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs* 2003; 174: 101–9.

Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanese M, Longoni PD, Matteucci P, et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* 2002;99(10): 3838–43.

Djouad, F., P. Plence, C. Bony, et al. Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood* 102(10):3837, 2003.

\_\_\_\_\_, C. Bony, F. Apparailly, P. Louis-Plence, C. Jorgensen, and D. Noel. Earlier onset of syngeneic tumors in the presence of mesenchymal stem cells. *Transplantation* 82(8):1060, 2006

Dominici M, Le Blank K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006;8(4): 315-317.

Dorsett-Martin, Wanda A. Rat models of skin wound healing: A review. *WOUND REP REG* 2004;12:591–599

Dwyer RM, Potter-Beirne SM, Harrington KA, Lowery AJ, Hennessy E, Murphy JM, Barry FP, O'Brien T, Kerin MJ. Monocyte chemotactic protein-1 secreted by primary breast tumors stimulates migration of mesenchymal stem cells. *Clin Cancer Res* 13: 5020-5027, 2007.

Eming SA, Morgan JR, Berger A: Gene therapy for tissue repair: approaches and prospects. *Br J Plast Surg* 1997, 50: 491–500.

Enoch, Stuart; Leaper, David John. Basic science of wound healing. *Surgery* 23:2, 2005 The Medicine Publishing Company Ltd

Falanga, Vincent. Physiology and pathophysiology of wound healing. In: Veves A, Giurini JM, Lo Gerfo FW, eds. *The diabetic foot: medical and surgical management*. Totowa, NJ: Human Press, 2002: 59–73.

\_\_\_\_\_. The chronic wound: impaired healing and solutions in the context of wound bed preparation. *Blood Cells Mol Dis* 2004; 32: 88–94.

\_\_\_\_\_. Wound healing and its impairment in the diabetic foot. *Lancet* 2005; 366: 1736–43

Fang BJ, Shi MX, Liao LM et al. Systemic infusion of FLK1(+) mesenchymal stem cells ameliorate carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice. *Transplantation* 2004;78:83– 88.

Fang, Y.; Gong, S-J.; Xu, Y-H; Hambly, B.D. Bao, S. Impaired cutaneous wound healing in granulocyte/macrophage colony-stimulating factor knockout mice. *British Journal of Dermatology* 2007 157, pp458–465

Fathke, Carrie; Wilson, Lynne; Hutter, Jonathan; Kapoor, Vishal; Smith, Andria; Hocking, Anne; Isik, Frank. Contribution of Bone Marrow-Derived Cells to Skin: Collagen Deposition and Wound Repair. *Stem Cells* 2004;22:812–822

Fortier, Lisa A. Stem Cells: Classifications, Controversies, and Clinical Applications. *Veterinary Surgery* 34:415–423, 2005

\_\_\_\_\_, Deriglasova UF, Kulagina NN, Panasuk AF, Rudakowa SF, Luria EA, Rudakow IA. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by in vitro colony assay method. *Exp Hematol.* 1974; 2: 83–92.

Fu, Xiaobing, Fang, Lijun, Li, Xiaokun, Cheng, Biao, Sheng, Zhiyong. Enhanced wound-healing quality with bone marrow mesenchymal stem cells autografting after skin injury. *Wound Rep Reg* (2006) 14 325–335

\_\_\_\_\_; Fang, Lijun; Li, Haihong; Li, Xiaokun; Cheng, Biao; Sheng, Zhiyong. Adipose tissue extract enhances skin wound healing. *Wound Rep Reg* (2007) 15 540–548

Gajiwala K, Gajiwala AL. Evaluation of lyophilised, gamma-irradiated amnion as a biological dressing. *Cell Tissue Bank* 2004;5: 73–80.

Galeano M, Deodato B, Altavilla D, Squadrito G; Seminara P; Marini H; Stagno d'Alcontres F; Colonna M; Calò M; Lo Cascio P; Torre V; Giacca M; Venuti FS; Squadrito F. Effect of recombinant adeno-associated virus vector-mediated vascular endothelial growth factor gene transfer on wound healing after burn injury. *Crit Care Med* 2003; 31:1017–1025

\_\_\_\_\_, Altavilla D, Cucinotta D, Russo, GT, Calò M, Bitto A, Marini H, Marini R, Adamo EB, Seminara P, Minutoli L, Torre V, Squadrito F. Recombinant human erythropoietin stimulates angiogenesis and wound healing in the genetically diabetic mouse. *Diabetes* 2004; 53:2509–2517

\_\_\_\_\_; Altavilla D; Bitto A; Minutoli L; Calò M; Lo Cascio P; Polito F; Giugliano G; Squadrito G; Mioni C; Giuliani D; Venuti FS; Squadrito F. Recombinant human erythropoietin improves angiogenesis and wound healing in experimental burn wounds. *Crit Care Med* 2006 Vol. 34, No. 4

García, Yolanda; Wilkins, Brendan; Collighan, Russell J; Griffin, MArtin; Pandit, Abhay. Towards development of a dermal rudiment for enhanced wound healing response. *Biomaterials.* 2007. En prensa

Grayson, W.L., Zhao, F., Izadpanah, R., Bunnell, B., and Ma, T. (2006). Effects of hypoxia on human mesenchymal stem cell expansion and plasticity in 3D constructs. *J. Cell Physiol* 207, 331-339.

\_\_\_\_\_, Zhao, F., Bunnell, B., and Ma, T. (2007). Hypoxia enhances proliferation and tissue formation of human mesenchymal stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 358, 948-953.

Gronthos S, Simmons PJ. The growth factor requirements of STRO-1-positive human bone marrow stromal precursors under serum-deprived conditions in vitro. *Blood* 1995;85:929–40.

- Guillot, Pascale V.; Cui, Wei; Fisk, Nicholas M.; Polak, Dame Julia. Stem cell differentiation and expansion for clinical applications of tissue engineering. *J. Cell. Mol. Med.* Vol 11, No 5, 2007 pp. 935-944
- Hanson Summer E, Bentz, Michael L, Hemmati Peiman. Mesenchymal stem cell therapy for nonhealing cutaneous wounds. *Plast. Reconstr. Surg.* 125: 510-516, 2010
- Hatina, Jiří; Schulz, Wolfgang A. (December 2008) Cancer Stem Cells – Basic Concepts. In: *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester.
- Haynesworth SE, Baber MA, Caplan AI. Cytokine expression by human marrow-derived mesenchymal progenitor cells in vitro: effects of dexamethasone and IL-1 alpha. *J Cell Physiol* 1996;166(3):585–92.
- He, Q., Wan, C., & Li, G. (2007). Concise review: multipotent mesenchymal stromal cells in blood. *Stem Cells*, 25, 69–77
- Heino, Terhi J; Hentunen, Teuvo A. and Väänänen, H. Kalervo. Conditioned medium from osteocytes stimulates the proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells and their differentiation into osteoblasts. *Experimental Cell Research* 294 (2004) 458– 468
- Hematti P. Role of mesenchymal stromal cells in solid organ transplantation. *Transplant Rev (Orlando)* 2008; 22:262-273
- Hom, David B. Contemporary concepts and progress in wound healing [Head And Neck Reconstruction]. 1999 Lippincott Williams & Wilkins, Inc. Volume 7(4) August 1999 p 193
- Hocking, Anne M and Gibran, Nicole S. Mesenchymal stem cells: Paracrine signaling and differentiation during cutaneous wound repair. *Experimental Cell Research* 316(2010) 2213-2219
- Hoogdujin MJ, Crop MJ, Peeters AM, et al. Human heart, spleen, and perirenal fat-derived mesenchymal stem cells have immunomodulatory capacities. *Stem cells Dev.* 2007;16:597-604
- Houghton J, Stoicov C, Nomura S, Rogers AB, Carlson J, Li H, Cai X, Fox JG, Goldenring JR, Wang TC. Gastric cancer originating from bone marrow-derived cells. *Science* 306: 1568-1571, 2004.
- Hung, Shih-Chieh; Pochampally, Radhika R.; Chen, Sy-Chi; Hsu, Shu-Ching; Prockop, Darwin J. Angiogenic Effects of Human Multipotent Stromal Cell Conditioned Medium Activate the PI3K-Akt Pathway in Hypoxic Endothelial Cells to Inhibit Apoptosis, Increase Survival, and Stimulate Angiogenesis. *STEM CELLS* 2007;25:2363–2370
- \_\_\_\_\_, Pochampally,R.R., Hsu,S.C., Sanchez,C., Chen,S.C., Spees,J., and Prockop,D.J. (2007). Short-Term Exposure of Multipotent Stromal Cells to Low Oxygen Increases Their Expression of CX3CR1 and CXCR4 and Their Engraftment In Vivo. *PLoS. ONE.* 2, e416.
- Jeffcoate WJ, Price P, Harding KG. Wound healing and treatments for people with diabetic foot ulcers. *Diabetes Metab Res Rev* 2004; 20 (suppl 1): S78–89.
- Kapoor M, Nomiya, T., Bruemmer, D., Kojima, F., Crofford, L.J. Growth factors and cytokines: Emphasis on their role in wound healing and atherosclerosis. *Current Anaesthesia & Critical Care* (2006) 17, 13–20

Karnoub AE, Dash AB, Vo AP, Sullivan A, Brooks MW, Bell GW, Richardson AL, Polyak K, Tubo R, Weinberg RA. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature* 449: 557-563, 2007.

Karp JM, Leng Teo GS. Mesenchymal stem cell homing: the devil is in the details. *Cell Stem Cell* 2009;4(3):206–16.

Keating A (2006) Mesenchymal stromal cells. *Curr.Opin.Hematol.* 13: 419–425.

Kim, Dong-Il; Kim, Mi-Jung; Joh, Jin-Hyun; Shin, Sung-Wook; Do, Young-Soo; Moon, Ji-Young; Kim, Na-Ri; Lim, Joung-Eun; Kim, Ae-Kyeong; Eo, Hyun-Seon; Kim, Byung-Soo; Cho, Seung-Woo; Yang, Seung-Hye; Park, Chan-Jeoung; Shim, Jong-Sup. Angiogenesis Facilitated by Autologous Whole Bone Marrow Stem Cell Transplantation for Buerger's Disease. *Stem Cells* 2006;24:1194–1200

Kim, Won-Serk; Park, Byung-Soon; Sung, Jong-Hyuk; Yang, Jun-Mo; Park, Seok-Beom; Kwak, Sahng-June; Park, Jeong-Soo. Wound healing effect of adipose-derived stem cells: A critical role of secretory factors on human dermal fibroblasts. *Journal of Dermatological Science* (2007) 48, 15—24

Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Shou M, Lee CW, Barr S, Fuchs S, Epstein SE. Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms. *Circulation* 2004; 109: 1543–9.

Krampera M, Glennie S, Dyson J, Scott D, Laylor R, Simpson E, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood* 2003;101(9): 3722–9.

Kuznetsov SA, Friedenstein AJ, Robey PG. Factors required for bone marrow stromal fibroblast colony formation in vitro. *Br J Haematol* 1997;97:561–70.

Lazennec, G., Jorgensen, C., 2008. Adult multipotent stromal cells and cancer: risk or benefit? *Stem Cells*.

Lee, Eun Young; Xia, Ying; Kim, Won-Serk; Kim, Myoung Hee; Kim, Tae Hwan; Kim, Kea Jeung; Park, Byung-Soon; Sung, Jong-Hyuk. Hypoxia-enhanced wound-healing function of adipose-derived stem cells: Increase in stem cell proliferation and up-regulation of VEGF and bFGF. *Wound Rep Reg* (2009) 17 540–547

Lennon, D.P.; J.M. Edmison; A.I. Caplan. Cultivation of rat marrow-derived mesenchymal stem cells in reduced oxygen tension: effects on in vitro and in vivo osteochondrogenesis. *J. Cell Physiol.* 2001;187: 345–55.

Lerman OZ, Galiano RD, Armour M, Levine JP, Gurtner GC. Cellular dysfunction in the diabetic fibroblast: impairment in migration, vascular endothelial growth factor production, and response to hypoxia. *Am J Pathol* 2003; 162: 303–12.

Lepperdinger, Günter; Brunauer, Regina; Jamnig, Angelika; Laschober, Gerhard; Kassem, Moustapha. Controversial issue: Is it safe to employ mesenchymal stem cells in cell-based therapies? *Experimental Gerontology* 43 (2008) 1018–1023

- Ling B; Feng D.Q.; Zhou Y.; Gao T.; Wei H.M.; Tian Z.G. Effect of conditioned medium of mesenchymal stem cells on the in vitro maturation and subsequent development of mouse oocyte. *Braz J Med Biol Res Online Ahead of Print*
- Ma Grayson, Frolich, et al. Hypoxia and Stem-cell based engineering of mesenchymal tissues. *Biotech Progress* 2009;25:32.
- Martin P, Parkhurst SM. Parallels between tissue repair and embryo morphogenesis. *Development* 2004; 131: 3021–34.
- Martinet L, Fleury-Cappellesso S, Gadelorge M, Dietrich G, Bourin P, Fournie JJ, et al. A regulatory cross-talk between Vgamma9Vdelta2 T lymphocytes and mesenchymal stem cells. *Eur J Immunol* 2009;39(3):752–62.
- Matushansky, I., E. Hernando, N. D. Socci, et al. Derivation of sarcomas from mesenchymal stem cells via inactivation of the Wnt pathway. *J. Clin. Invest.* 117(11):3248, 2007.
- McFarlin, Kellie; Gao, Xiaohua; Liu, Yong Bo; Dulchavsky, Deborah S; Kwon, David; Arbab, Ali S; Bansal, Mona; Li, Yi; Chopp, Michael; Dulchavsky, Scott A; Gautam, Subhash C. Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells accelerate wound healing in the rat. *Wound Rep Reg* (2006) 14 471–478
- Mehendale FMP, Martin P. The cellular and molecular events of wound healing. In: Falanga V, ed. *Cutaneous wound healing*. London: Martin Dunitz, 2001: 15–37.
- Michalopoulos GK, DeFrances MC. 1997. Liver regeneration. *Science* 276: 60–66
- Moon, M.H., Kim,S.Y., Kim,Y.J., Kim,S.J., Lee,J.B., Bae,Y.C., Sung,S.M., and Jung,J.S. (2006). Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells improve postnatal neovascularization in a mouse model of hindlimb ischemia. *Cell Physiol Biochem.* 17, 279-290.
- Muschler GF, Nakamoto C, Griffith LG. Engineering principles of clinical cellbased tissue engineering. *J Bone Joint Surg Am* 2004; 86:1541—1558.
- Musina, R. A., Yegorov, Ye. Ye.and Belyavsky A. V. Stem Cells: Properties and Prospective Medical Applications. *Molecular Biology*, Vol. 38, No. 4, 2004, pp. 469–481. Translated from *Molekulyarnaya Biologiya*, Vol. 38, No. 4, 2004, pp. 563–577.
- Nemeth K, Leelahavanichkul A, Yuen PS, Mayer B, Parmelee A, Doi K, et al. Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nat Med* 2009;15(1):42–9.
- Ocke Reis, Paulo Eduardo. Bone marrow stem cells and their role in angiogenesis. *J Vasc Br* 2005;4(4):366-70.
- Owen ME. 1988. The marrowstromal cell system. In *Marrow Stromal Cells in Culture*, ed. JN Beresford,MEOwen, pp. 88– 110. Cambridge, UK: Cambridge Univ. Press
- Parekkadan B, van Poll D, Suganuma K, Carter EA, Berthiaume F, Tilles AW, et al. Mesenchymal stem cell-derived molecules reverse fulminant hepatic failure. *PLoS One* 2007;2(9):e941

- Patel, Ketan M.; Crisostomo, Paul; Lahm, Tim; Markel, Troy; Herring, Christine; Wang, Meijing; Meldrum, Kirstan K.; Lillemoe, Keith D.; and Meldrum, Daniel R. Mesenchymal Stem Cells Attenuate Hypoxic Pulmonary Vasoconstriction by a Paracrine Mechanism. *Journal of Surgical Research* 143, 281–285 (2007)
- Phinney DG, and Prockop, Darwin J. Concise Review: Mesenchymal Stem/Multi-Potent Stromal Cells (MSCs): The State of Transdifferentiation and Modes of Tissue Repair - Current Views. *Stem Cells Express*, published online October 4, 2007
- Potten CS, Loeffler M. 1990. Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development* 110:1001–20
- Puissant B, Barreau C, Bourin P, et al. Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: Comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *Br J Haematol.* 2005;129:118-129
- Rehman, J., Traktuev, D., Li, J., Merfeld-Clauss, S., Temm-Grove, C.J., Bovenkerk, J.E., Pell, C.L., Johnstone, B.H., Consideine, R.V., and March, K.L. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation* 2004; 109, 1292-1298.
- Restrepo Jiménez, Sonia Ximena. Secreción de factores angiogénicos en condiciones de normoxia e hipoxia en células stem mesenquimales humanas derivadas de médula osea y tejido adiposo. Tesis de Grado (Maestría en Microbiología) Univ. Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Maestría en Microbiología.
- Rhett, J. Matthew; Ghatnekar, Gautam S.; Palatinus, Joseph A.; O'Quinn, Michael.; Yost, Michael J and Gourdie, Robert G. Novel therapies for scar reduction and regenerative healing of skin wounds. Article in press. *Trends in Biotechnology* Vol.xxx No.x. 2008, TIBTEC-603; No of Pages 8
- Rasmusson I, Uhlin M, Le Blanc K, Levitsky V. Mesenchymal stem cells fail to trigger effector functions of cytotoxic T lymphocytes. *J Leukoc Biol* 2007; 82(4):887–93.
- Ruszczak, Zbigniew and Schwartz, Robert A. Modern Aspects of Wound Healing: An Update. *Dermatol Surg* 2000; 26:219-229
- Sadiq, Timothy S. and Gerber, David A. Stem Cells in Modern Medicine: Reality or Myth? *Journal of Surgical Research* 122, 280–291 (2004)
- Semedo P., Wang P.M., Andreucci T.H., Cenedeze M.A, Teixeira V.P.A., Reis M.A., Pacheco-Silva A., and Câmara, N.O.S. Mesenchymal stem cells ameliorate tissue damages triggered by renal ischemia and reperfusion injury. *Transplantation proceedings*, 39, 421–423 (2007)
- Sensebé, L., Krampera, M., Schrezenmeier, H., P. Bourin, P. & Giordanos, R. Mesenchymal stem cells for clinical application. *Vox Sanguinis* (2010) 98, 93–107
- Short, B., Brouard, N., Occhiodoro-Scott, T., Ramakrishnan, A., and Simmons, P.J. 2003. Mesenchymal stem cells. *Arch. Med. Res* 34:565-571.
- Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med* 1999; 341: 738–46.
- Sotiropoulou PA, Perez SA, Gritzapis AD, Baxevanis CN, Papamichail M. Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells. *Stem Cells* 2006;24(1):74–85.

Spaggiari GM, Capobianco A, Becchetti S, Mingari MC, Moretta L. Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation. *Blood* 2006;107(4):1484–90.

Stocum, David L. Stem cells in regenerative biology and medicine. *Wound Rep Reg* 2001; 9:429-442

Studer L, Csete M, Lee SH, et al. Enhanced proliferation, survival, and dopaminergic differentiation of CNS precursor in lowered oxygen. *J Neurosci* 2000;20:7377.

Suga H, Eto H, Shigeura T, Inoue K, Aoi N, Kato H, et al. IFATS series: FGF-2- induced HGF secretion by adipose-derived stromal cells inhibits post-injury fibrogenesis through a JNK-dependent mechanism. *Stem Cells* 2008.

Sundin, M., C. Orvell, I. Rasmusson, B. Sundberg, O. Ringden, and K. Le Blanc. Mesenchymal stem cells are susceptible to human herpesviruses, but viral DNA cannot be detected in the healthy seropositive individual. *Bone Marrow Transplant.* 37(11):1051, 2006.

Tanner JC, Vandeput J, Oiley JF. The mesh skin graft. *Plast Reconstr Surg* 1964; 34:287-92

Timmers, Leo; Lim, Sai Kiang; Arslan, Fatih; Armstrong, Jeffrey S.; Hoefer, Imo E; Doevendans Pieter A; Piek, Jan J.; El Oakley, Reida Menshawe; Choo, Andre; Lee, Chuen Neng; Pasterkamp, Gerard; de Kleijn, Dominique P.V. Reduction of myocardial infarct size by human mesenchymal stem cell conditioned médium. *Stem Cell Research* (2008) 1, 129–137

Togel F, Weiss K, Yang Y, Hu Z, Zhang P, Westenfelder C. Vasculotropic, paracrine actions of infused mesenchymal stem cells are important to the recovery from acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007;292(5): F1626–35.

Toy LW. Matrix metalloproteinases: their function in tissue repair. *J Wound Care* 2005; 14: 20–22.

Traggiai E, Volpi S, Schena F, Gattorno M, Ferlito F, Moretta L, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells induce both polyclonal expansion and differentiation of B cells isolated from healthy donors and systemic lupus erythematosus patients. *Stem Cells* 2008;26(2):562–9.

Traktuev DO, Merfeld-Clauss S, Li J, Kolonin M, Arap W, Pasqualini R, et al. A population of multipotent CD34-positive adipose stromal cells share pericyte and mesenchymal surface markers, reside in a periendothelial location, and stabilize endothelial networks. *Circ Res* 2008;102(1):77–85.

Trivedi P, Hematti P. Derivation and immunological characterization of mesenchymal stromal cells from human embryonic stem cells. *Exp Hematol.* 2008;36:350-359

Valfre di Bonzo, L., Ferrero, I., Cravanzola, C., Mareschi, K., Rustichelli, D., Novo, E., et al. (in press). Human mesenchymal stem cells as a two-edged sword in hepatic regenerative medicine: Engraftment and hepatocyte differentiation versus profibrogenic potential. *Gut*.

van Poll, D.; Parekkadan, B.; Borel Rinkes, I.H.M.; Tilles, A.W.; Yarmush M.L. Mesenchymal Stem Cell Therapy for Protection and Repair of Injured Vital Organs. *Cellular and Molecular Bioengineering*, Vol. 1, No. 1, March 2008

Vats A., Tolley N.S., Polak J.M.; Buttery L.D.K. Stem cells: sources and applications: a review article (2002) Clin. Otolaryngol. 27, 227–232

Villaron EM, Almeida J, Lopez-Holgado N, et al. Mesenchymal stem cells are present in peripheral blood and can engraft after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Haematologica 2004;89:1421–7.

Wagner, Joseph; Kean, Thomas; Young, Randell; Dennis, James E; Caplan, Arnold I. Optimizing mesenchymal stem cell-based therapeutics. Current Opinion in Biotechnology 2009, 20:531–536

Wallerstein, Nina. Violencia en Colombia: reflexiones de una profesora visitante. Rev. Fac. Nac. Salud Pública 2000; 18(2): 101-115.

Wang, Jian-an; Fan, You-qi; Li, Chang-ling; He, Hong; Sun, Yong; Lv, Bin-jian. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells transplanted into damaged rabbit heart to improve heart function. J Zhejiang Univ SCI 2005 6B(4):242-248

Watt FM. 1998. Epidermal stem cells: markers, patterning and the control of stem cell fate. Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B 353:831–37

Williamson, D and Harding, Keith. Wound Healing. 2004, Medicine 32:12.

Wu, Yaojiong; Chen, Liwen; Scott, Paul G.; Tredget, Edward E. Mesenchymal Stem Cells Enhance Wound Healing Through Differentiation and Angiogenesis. STEM CELLS 2007;25:2648–2659

Xiang, Mei-Xiang, He, Ai-Na, Wang, Jian-An, Gui, Chun. Protective paracrine effect of mesenchymal stem cells on cardiomyocytes. J Zhejiang Univ Sci B 2009 10(8):619-624

Yamamoto T, Horikawa N, Komuro Y, Hara, Y. Effect of topical application of a stable prostacyclin analogue, SM-10902 on wound healing in diabetic mice. Eur J Pharmacol 1996; 302:53–60

Yen, B. Linju; Yen, Men-Luh. Mesenchymal Stem Cells and Cancer — for Better or for Worse? Journal of Cancer Molecules 4(1): 5-9, 2008.

Yen, C. C.; Yang S. H.; Lin, C. Y.; Chen, C. M. Stem cells in the lung parenchyma and prospects for lung injury therapy. European Journal of Clinical Investigation (2006) 36, 310–319

Yoshikawa, Takafumi; Mitsuno, Hiroya; Nonaka, Ichisa; Sen, Yasunori; Kawanishi, Kouichi; Inada, Yuji; Takakura, Yoshinori; Okuchi, Kazuo; Nonomura, Akitaka. Wound Therapy by Marrow Mesenchymal Cell Transplantation. Plast. Reconstr. Surg. 121: 860, 2008.

Zandstra, Peter W.; Nagy, Andras. Stem Cell Bioengineering. Annu. Rev. Biomed. Eng. 2001. 3:275–305

Zhu, W., Xu, W., Jiang, R., Qian, H., Chen, M., Hu, J., Cao, W., Han, C., Chen, Y., 2006. Mesenchymal stem cells derived from bone marrow favor tumor cell growth in vivo. Exp. Mol. Pathol. 80, 267–274.

<http://www.copewithcytokines.de/cope.cgi?key=Conditioned%20medium>. Consultada el 25.02.09

[http://www.pharmcast.com/Patents/Yr2002/April2002/041602/6372494\\_Culture041602.htm](http://www.pharmcast.com/Patents/Yr2002/April2002/041602/6372494_Culture041602.htm). Consultada el 04.03.09

<http://www.patentstorm.us/patents/6372494/fulltext.html>. Consultada el 04.03.09

<http://www.mintransporte.gov.co/pnsv/Estadisticas.htm>. Consultada el 15.08.08

<http://saludcapital.gov.co/secsalud.html>. Consultada el 20.06.08

## ANEXOS

Anexo A. Medidas y porcentaje de contracción diario de las heridas para la prueba 1. (R1...R8: Ratón 1....Ratón 8; X̄: Promedio)

PRUEBA 1 MO-H vs MO-N																											
DÍA	C									MO-H									MO-N								
	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	X̄	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	X̄	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	X̄
Día 0	5,45	6,1	5,36	5,18	5,03	5,23	4,97	5,08	<b>5,3</b>	4,96	5,01	4,98	5,09	5,01	5,02	4,99	5,17	<b>5,03</b>	4,99	5,4	5	4,99	4,99	5,1	5	5,09	<b>5,07</b>
Día 1	5,08	5,9	5,12	4,6	4	4,95	4,5	4,01	<b>4,77</b>	3,3	4	3,7	4,5	3,35	3,28	3,97	4,75	<b>3,86</b>	3,5	5,02	3,83	3,7	4,19	4,15	4,05	4,2	<b>4,08</b>
Día 2	4,89	5,6	3,67	3,32	3,91	3,52	4,47	3,92	<b>4,16</b>	3,01	3,92	2,44	4,2	3,77	3,1	2,38	4,01	<b>3,35</b>	3,3	4,97	2,79	2,83	4,11	3,06	3,92	3,76	<b>3,59</b>
Día 3	4,58	5,13	3,58	3,3	3,79	2,47	3,91	3,01	<b>3,72</b>	2,91	3,5	2,11	3,05	3,15	2,91	2,3	3,27	<b>2,9</b>	3,05	4,76	2,62	2,4	3,32	2,77	3,12	2,94	<b>3,12</b>
Día 4	4,12	4,49	3,4	3,3	3,59	2,41	3,73	2,13	<b>3,4</b>	2,57	3,25	1,9	2,79	3	2,31	2,1	3,03	<b>2,62</b>	2,92	4,55	2,3	2,34	3,15	2,57	3,12	2,88	<b>2,95</b>
Día 5	4,11	4,47	3,33	3,29	3,43	1,9	3,6	1,62	<b>3,22</b>	2,3	3,22	1,25	2,3	2,85	1,83	1,68	2,51	<b>2,24</b>	2,38	3,56	2,17	1,86	3,11	2,35	2,35	2,31	<b>2,51</b>
Día 6	4,05	4,35	3,33	3,29	2,86	1,63	3,6	1,59	<b>3,09</b>	2,3	2,72	1,09	1,77	2,84	1,68	1,49	1,99	<b>1,99</b>	2,16	1,83	2,17	1,18	3,11	2,18	2,11	1,93	<b>2,08</b>
Día 7	3,34	3,86	0	2,31	2,45	1,56	3,11	1,4	<b>2,25</b>	1	0	0	1,45	0	0	0	0	<b>0,31</b>	2,11	0	1,42	0	2,73	0	0	1,78	<b>1,01</b>
Día 8	3,1	3,68	0	0	2,32	2,45	0,84	<b>1,77</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	<b>0</b>	0	0	0	0	2,01	0	0	<b>0,29</b>	
Día 9	2,88	3,25	0	0	1,95	1,81	0	<b>1,41</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	<b>0</b>	0	0	0	0	2,01	0	0	<b>0,29</b>	
Día 10	2,2	3,12	0	0	0	1,75	0	<b>1,01</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	<b>0</b>	0	0	0	0	1,99	0	0	<b>0,28</b>	
Día 11	2,07	2,43	0	0	0	1,5	0	<b>0,86</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	<b>0</b>	0	0	0	0	0	0	0	<b>0</b>	
Día 12	1,61	1,97	0	0	0	1,36	0	<b>0,71</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	<b>0</b>	0	0	0	0	0	0	0	<b>0</b>	
Día 13	1,56	1,91	0	0	0	1,15	0	<b>0,66</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	<b>0</b>	0	0	0	0	0	0	0	<b>0</b>	
Día 14	1,03	1,91	0	0	0	1,15	0	<b>0,58</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	<b>0</b>	0	0	0	0	0	0	0	<b>0</b>	

DÍA	H.C									H. MOH									H. MON								
	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	X̄	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	X̄	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	X̄
Día 0	0	0	0	0	0	0	0	0	<b>0</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	<b>0</b>	0	0	0	0	0	0	0	<b>0</b>	
Día 1	6,79	3,28	4,48	11,2	20,5	5,35	9,46	21,1	<b>10,3</b>	33,5	20,2	25,7	11,6	33,1	34,7	20,4	8,12	<b>23,4</b>	29,9	7,04	23,4	25,9	16	18,6	19	17,5	<b>19,7</b>
Día 2	10,3	8,2	31,5	35,9	22,3	32,7	10,1	22,8	<b>21,7</b>	39,3	21,8	51	17,5	24,8	38,2	52,3	22,4	<b>33,4</b>	33,9	7,96	44,2	43,3	17,6	40	21,6	26,1	<b>29,3</b>
Día 3	16	15,9	33,2	36,3	24,7	52,8	21,3	40,7	<b>30,1</b>	41,3	30,1	57,6	40,1	37,1	42	53,9	36,8	<b>42,4</b>	38,9	11,9	47,6	51,9	33,5	45,7	37,6	42,2	<b>38,7</b>
Día 4	24,4	26,4	36,6	36,3	28,6	53,9	24,9	58,1	<b>36,2</b>	48,2	35,1	61,8	45,2	40,1	54	57,9	41,4	<b>48</b>	41,5	15,7	54	53,1	36,9	49,6	37,6	47,3	<b>42</b>
Día 5	24,6	26,7	37,9	36,5	31,8	63,7	27,6	68,1	<b>39,6</b>	53,6	35,7	74,9	54,8	43,1	63,5	66,3	51,5	<b>55,4</b>	52,3	34,1	56,6	62,7	37,7	53,9	53	54,6	<b>50,6</b>
Día 6	25,7	28,7	37,9	36,5	43,1	68,8	27,6	68,7	<b>42,1</b>	53,6	45,7	78,1	65,2	43,3	66,5	70,1	61,5	<b>60,5</b>	56,7	66,1	56,6	76,4	37,7	57,3	57,8	62,1	<b>58,8</b>
Día 7	38,7	36,7	100	55,4	51,3	70,2	37,4	72,4	<b>57,8</b>	79,8	100	100	71,5	100	100	100	<b>93,9</b>	57,7	100	71,6	100	45,3	100	100	65	<b>80</b>	
Día 8	43,1	39,7	100	100	53,9	50,7	83,5	<b>67,3</b>	100	100	100	100	100	100	100	100	<b>100</b>	100	100	100	100	59,7	100	100	100	<b>94,2</b>	
Día 9	47,2	46,7	100	100	61,2	63,6	100	<b>74,1</b>	100	100	100	100	100	100	100	100	<b>100</b>	100	100	100	100	59,7	100	100	100	<b>94,2</b>	
Día 10	59,6	48,9	100	100	100	64,8	100	<b>81,9</b>	100	100	100	100	100	100	100	100	<b>100</b>	100	100	100	100	60,1	100	100	100	<b>94,3</b>	
Día 11	62	60,2	100	100	100	69,8	100	<b>84,6</b>	100	100	100	100	100	100	100	100	<b>100</b>	100	100	100	100	100	100	100	100	<b>100</b>	
Día 12	70,5	67,7	100	100	100	72,6	100	<b>87,3</b>	100	100	100	100	100	100	100	100	<b>100</b>	100	100	100	100	100	100	100	100	<b>100</b>	
Día 13	71,4	68,7	100	100	100	76,9	100	<b>88,1</b>	100	100	100	100	100	100	100	100	<b>100</b>	100	100	100	100	100	100	100	100	<b>100</b>	
Día 14	81,1	68,7	100	100	100	76,9	100	<b>89,5</b>	100	100	100	100	100	100	100	100	<b>100</b>	100	100	100	100	100	100	100	100	<b>100</b>	

Anexo B: Medidas y porcentaje de contracción diario de las heridas para la prueba 2. (R1...R8: Ratón 1....Ratón 8; X: Promedio)

PRUEBA 2 Ad-H vs Ad-N																												
CIERRE DE HERIDA	DÍA	C										Ad-H										Ad-N						
		R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	X	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	X	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	X
		Día 0	4,59	4,67	4,78	4	5,43	4,32	4,3	5,25	<b>4,67</b>	3,99	4,33	4,35	3,9	4,71	4,95	4,03	4	<b>4,28</b>	4,46	4,4	4,48	4,25	4,69	5,27	4,3	4,3
Día 1	4,08	4,17	4,27	3,93	4,93	3,8	4,22	5,13	<b>4,32</b>	2,69	3,83	3,81	3,66	3,78	4,43	3,21	3,92	<b>3,67</b>	3,54	3,83	3,98	3,95	4,22	4,77	4,07	4,25	<b>4,08</b>	
Día 2	3,66	4,11	4,11	3,79	4,53	3,78	3,7	4,25	<b>3,99</b>	2,35	3,23	3,68	3,5	2,26	4,14	3,1	2,4	<b>3,08</b>	3,53	3,44	3,94	3,41	2,9	4,05	3,5	3,22	<b>3,5</b>	
Día 3	3,52	4,1	4,08	3,4	4,26	3,49	3,5	4,13	<b>3,81</b>	2,2	2,52	3,52	3,2	1,6	3,23	3,1	2,2	<b>2,7</b>	3,53	3,24	3,87	2,5	2,21	3,54	3,5	3,12	<b>3,19</b>	
Día 4	3,5	3,83	3,99	3,28	3,94	3,45	3,35	4,13	<b>3,68</b>	1,93	2,47	3,33	3,2	1,24	3,03	3,01	2,14	<b>2,54</b>	3,51	3,01	3,51	2,48	1,91	3,37	3,33	2,89	<b>3</b>	
Día 5	3,2	3,62	3,97	3,27	3,79	3,16	3,18	4,1	<b>3,54</b>	1,66	1,73	3,33	3,18	1,15	2,93	2,88	2,14	<b>2,38</b>	3,4	2,87	2,67	2,47	1,43	3,05	2,75	2,84	<b>2,69</b>	
Día 6	3,15	2,88	3,57	3,27	3,4	2,62	3,1	4,05	<b>3,26</b>	0,95	1,28	3,17	2,41	0,84	1,89	1,4	2,04	<b>1,75</b>	3,18	2,52	2,2	2,35	1,18	2,9	2,65	2,75	<b>2,47</b>	
Día 7	2,6	2,85	1,8	3,2	3,35	2,27	2,99	3,97	<b>2,88</b>	1,04	1,28	2,41	2,28	0,74	1,5	1,04	0,83	<b>1,39</b>	3,03	2,16	1,8	2,32	1,14	2,72	2	2,43	<b>2,2</b>	
Día 8	1,02	1,3	2,26	2,5		1,05	2,45	2,65	<b>1,89</b>	1,04	1,28	1,96	1,85		1,09	1,01	0,56	<b>1,26</b>	2,22	1,11	1,73	2,25		2,6	0	2	<b>1,7</b>	
Día 9	0,51	1,41	1,97	1,95		0,53	2,26	2,18	<b>1,54</b>	0,52	1,16	1,49	1,41		0,55	0,83	0,28	<b>0,89</b>	1,72	1,04	1,42	1,13		2,04	0	1	<b>1,19</b>	
Día 10	0	1,51	1,67	1,4		0	2,1	1,7	<b>1,2</b>	0	1,04	1,01	0,96		0	0,65	0	<b>0,52</b>	1,22	0,96	1,11	0		1,48	0	0	<b>0,68</b>	
Día 11	0	1,2	0,9	0		0	1,8	0	<b>0,56</b>	0	0,96	1,74	0,85		0	0	0	<b>0,51</b>	0,98	0	0	0		1,42	0	0	<b>0,34</b>	
Día 12	0	0	0	0		0	0	0	<b>0</b>	0	0	1,66	0		0	0	0	<b>0,24</b>	0,88	0	0	0		0,79	0	0	<b>0,24</b>	
Día 13	0	0	0	0		0	0	0	<b>0</b>	0	0	0	0		0	0	0	<b>0</b>	0	0	0	0		0,66	0	0	<b>0,09</b>	
Día 14	0	0	0	0		0	0	0	<b>0</b>	0	0	0	0		0	0	0	<b>0</b>	0	0	0	0		0,45	0	0	<b>0,06</b>	

PORCENTAJE DE CONTRACCIÓN	DÍA	H.C										H. AdH										H. AdN						
		R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	X	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	X	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	X
		Día 0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	<b>0</b>	0	0	0	0	0	0	0	<b>0</b>	0	0	0	0	0	0	0	0
Día 1	11,1	10,7	10,7	1,75	9,21	12	1,86	2,29	<b>7,45</b>	32,6	11,5	12,4	6,15	19,7	10,5	20,3	2	<b>14,4</b>	20,6	13	11,2	7,06	10	9,49	5,35	1,16	<b>9,73</b>	
Día 2	20,3	12	14	5,25	16,6	12,5	14	19	<b>14,2</b>	41,1	25,4	15,4	10,3	52	16,4	23,1	40	<b>28</b>	20,9	21,8	12,1	19,8	38,2	23,1	18,6	25,1	<b>22,4</b>	
Día 3	23,3	12,2	14,6	15	21,5	19,2	18,6	21,3	<b>18,2</b>	44,9	41,8	19,1	17,9	66	34,7	23,1	45	<b>36,6</b>	20,9	26,4	13,6	41,2	52,9	32,8	18,6	27,4	<b>29,2</b>	
Día 4	23,7	18	16,5	18	27,4	20,1	22,1	21,3	<b>20,9</b>	51,6	43	23,4	17,9	73,7	38,8	25,3	46,5	<b>40</b>	21,3	31,6	21,7	41,8	59,3	36,1	22,6	32,8	<b>33,4</b>	
Día 5	30,3	22,5	16,9	18,3	30,2	26,9	26	21,9	<b>24,1</b>	58,4	60	23,4	18,5	75,6	40,8	28,5	46,5	<b>44</b>	23,8	34,8	40,4	41,9	69,5	42,1	36	34	<b>40,3</b>	
Día 6	31,4	38,3	25,3	18,3	37,4	39,4	27,9	22,9	<b>30,1</b>	76,2	70,4	27,1	38,2	82,2	61,8	65,3	49	<b>58,8</b>	28,7	42,7	50,9	44,7	74,8	45	38,4	36	<b>45,2</b>	
Día 7	43,4	39	62,3	20	38,3	47,5	30,5	24,4	<b>38,2</b>	73,9	70,4	44,6	41,5	84,3	69,7	74,2	79,3	<b>67,2</b>	32,1	50,9	59,8	45,4	75,7	48,4	53,5	43,5	<b>51,2</b>	
Día 8	77,8	72,2	52,7	37,5		75,7	43	49,5	<b>55,5</b>	73,9	70,4	54,9	52,6		78	74,9	86	<b>68,8</b>	50,2	74,8	61,4	47,1		50,7	100	53,5	<b>64,5</b>	
Día 9	88,9	69,9	58,9	51,3		87,8	47,1	58,6	<b>62,4</b>	87	73,2	65,9	64		89	79,4	93	<b>77,1</b>	61,4	76,5	68,3	73,5		61,3	100	76,7	<b>76,1</b>	
Día 10	100	67,7	65,1	65		100	51,2	67,6	<b>69,4</b>	100	76	76,8	75,4		100	83,9	100	<b>85,3</b>	72,6	78,2	75,2	100		71,9	100	100	<b>87,7</b>	
Día 11	100	74,3	81,2	100		100	58,1	100	<b>85,6</b>	100	77,8	60	78,2		100	100	100	<b>86</b>	78	100	100	100		73,1	100	100	<b>96,3</b>	
Día 12	100	100	100	100		100	100	100	<b>100</b>	100	100	61,8	100		100	100	100	<b>93,6</b>	80,3	100	100	100		85	100	100	<b>96,7</b>	
Día 13	100	100	100	100		100	100	100	<b>100</b>	100	100	100	100		100	100	100	<b>100</b>	100	100	100	100		87,5	100	100	<b>100</b>	
Día 14	100	100	100	100		100	100	100	<b>100</b>	100	100	100	100		100	100	100	<b>100</b>	100	100	100	100		91,5	100	100	<b>100</b>	

Anexo C: Medidas y porcentaje de contracción diario de las heridas para la prueba 3. (R1...R8: Ratón 1....Ratón 8; X̄: Promedio)

PRUEBA 3 AdH vs MOH																											
DÍA	H.C									H. AdH									H. MOH								
	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	X̄	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	X̄	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	X̄
Día 0	4,38	4,47	4,11	4,85	4,5	4,1	4,6	4,05	<b>4,38</b>	4,04	4,05	5	4,94	4	3,9	4	4	<b>4,24</b>	4	4,05	4,6	4,63	3,95	4,71	4,25	4	<b>4,27</b>
Día 1	3,9	4,32	4,05	4,68	4,4	4,04	4,58	3,73	<b>4,21</b>	3,8	3,94	4,6	4,52	3,7	3,85	3,42	3,9	<b>3,97</b>	3,78	4,05	4,16	4,3	3,94	4,5	3,83	3,6	<b>4,02</b>
Día 2	3,07	4,3	3,67	4	3,9	3,94	3,65	3,43	<b>3,75</b>	3,38	3,55	3,12	4,41	3,7	1,86	3,56	3,4	<b>3,37</b>	2,81	2	2,7	4	3,94	4,37	3,6	3,54	<b>3,37</b>
Día 3	2	4,28	3,37	3,92	3,6	3,6	3,56	3,43	<b>3,47</b>	2,3	3,49	2,76	4,26	3,63	1,5	3,42	3,05	<b>3,05</b>	2,36	1,4	2,5	3,9	3,63	4,02	3,4	3,2	<b>3,05</b>
Día 4	1,6	4,27	3,3	3,76	3,53	3,42	3,31	3,1	<b>3,29</b>	1,98	3,3	2,2	3,88	3,61	1,44	3,42	2,47	<b>2,79</b>	1,9	1,1	2,11	3,87	3,61	4,01	2,99	2,75	<b>2,79</b>
Día 5	1,56	4,2	3,12	3,76	3,5	3,37	3,3	2,98	<b>3,22</b>	1,82	2,95	2,04	3,88	2,32	1,44	3,39	2,21	<b>2,51</b>	1,8	1,97	1,6	3,7	3,57	4,01	2,93	2,71	<b>2,79</b>
Día 6	1,5	4,2	3,04	3,62	3,45	3,33	3,27	2,94	<b>3,17</b>	1,82	2,84	1,96	3,81	2,23	1,38	3,33	2,19	<b>2,45</b>	1,8	2	1,59	3,67	2,45	3,97	2,4	2,7	<b>2,57</b>
Día 7	1,4	4,05	3	3	3,32	3,3	3,22	2,91	<b>3,03</b>	0	2,74	0	3,78	2,05	1,35	3,3	2,12	<b>1,92</b>	0	1,15	1,59	3,45	2	3,75	0	2,7	<b>1,83</b>
Día 8	0	3,63	2,7	2,94	1,89	2,99	2,65		<b>2,4</b>	0	1,45	0	3,67	2,07	1,28	3,21		<b>1,67</b>	0	1,1	0	3,35	1,75	3,3	0		<b>1,36</b>
Día 9	0	2,53	2,1	2,7	1,5	2,2	2,2		<b>1,89</b>	0	1,28	0	3,35	1,27	1,13	3,1		<b>1,45</b>	0	0	0	2,37	1,43	3	0		<b>0,97</b>
Día 10	0	1,8	1,65	2,24	1,76	1,3	2,03		<b>1,54</b>	0	1,2	0	2,57	0,91	0	2,95		<b>1,09</b>	0	0	0	1,9	1,85	2,41	0		<b>0,88</b>
Día 11	0	1,64	0	1,9	1,73	1,26	1,65		<b>1,17</b>	0	1,08	0	1,9	0,78	0	2,8		<b>0,94</b>	0	0	0	1,7	1,6	2,28	0		<b>0,8</b>
Día 12	0	1,21	0	1,65	1,2	0	0		<b>0,58</b>	0	0,96	0	1,6	0	0	1,81		<b>0,62</b>	0	0	0	1,61	0	0	0		<b>0,23</b>
Día 13	0	1,07	0	1,58	1,2	0	0		<b>0,55</b>	0	0,74	0	0	0	0	1,11		<b>0,26</b>	0	0	0	0	0	0	0		<b>0</b>
Día 14	0	0	0	1,41	0	0	0		<b>0,2</b>	0	0,37	0	0	0	0	1,06		<b>0,2</b>	0	0	0	0	0	0	0		<b>0</b>
Día 0	0	0	0	0	0	0	0	0	<b>0</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	<b>0</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	<b>0</b>
Día 1	11	3,36	1,46	3,51	2,22	1,46	0,43	7,9	<b>3,91</b>	5,94	2,72	8	8,5	7,5	1,28	14,5	2,5	<b>6,37</b>	5,5	0	9,57	7,13	0,25	4,46	9,88	10	<b>5,85</b>
Día 2	29,9	3,8	10,7	17,5	13,3	3,9	20,7	15,3	<b>14,4</b>	16,3	12,3	37,6	10,7	7,5	52,3	11	15	<b>20,4</b>	29,8	50,6	41,3	13,6	0,25	7,22	15,3	11,5	<b>21,2</b>
Día 3	54,3	4,25	18	19,2	20	12,2	22,6	15,3	<b>20,7</b>	43,1	13,8	44,8	13,8	9,25	61,5	14,5	23,8	<b>28,1</b>	41	65,4	45,7	15,8	8,1	14,6	20	20	<b>28,8</b>
Día 4	63,5	4,47	19,7	22,5	21,6	16,6	28	23,5	<b>25</b>	51	18,5	56	21,5	9,75	63,1	14,5	38,3	<b>34,1</b>	52,5	72,8	54,1	16,4	8,61	14,9	29,6	31,3	<b>35</b>
Día 5	64,4	6,04	24,1	22,5	22,2	17,8	28,3	26,4	<b>26,5</b>	55	27,2	59,2	21,5	42	63,1	15,3	44,8	<b>41</b>	55	61,4	65,2	20,1	9,62	14,9	31,1	32,3	<b>34,9</b>
Día 6	65,8	6,04	26	25,4	23,3	18,8	28,9	27,4	<b>27,7</b>	55	29,9	60,8	22,9	44,3	64,6	16,8	45,3	<b>42,4</b>	55	60,6	65,4	20,7	38	15,7	43,5	32,5	<b>40,2</b>
Día 7	68	9,4	27	38,1	26,2	19,5	30	28,1	<b>30,8</b>	100	32,3	100	23,5	48,8	65,4	17,5	47	<b>54,3</b>	100	71,6	65,4	25,5	49,4	20,4	100	32,5	<b>58,1</b>
Día 8	100	18,8	34,3	39,4	58	27,1	42,4		<b>45,7</b>	100	64,2	100	25,7	48,3	67,2	19,8		<b>60,7</b>	100	72,8	100	27,6	55,7	29,9	100		<b>69,4</b>
Día 9	100	43,4	48,9	44,3	66,7	46,3	52,2		<b>57,4</b>	100	68,4	100	32,2	68,3	71	22,5		<b>66,1</b>	100	100	100	48,8	63,8	36,3	100		<b>78,4</b>
Día 10	100	59,7	59,9	53,8	60,9	68,3	55,9		<b>65,5</b>	100	70,4	100	48	77,3	100	26,3		<b>74,5</b>	100	100	100	59	53,2	48,8	100		<b>80,1</b>
Día 11	100	63,3	100	60,8	61,6	69,3	64,1		<b>74,2</b>	100	73,3	100	61,5	80,5	100	30		<b>77,9</b>	100	100	100	63,3	59,5	51,6	100		<b>82,1</b>
Día 12	100	72,9	100	66	73,3	100	100		<b>87,5</b>	100	76,3	100	67,6	100	100	54,8		<b>85,5</b>	100	100	100	65,2	100	100	100		<b>95</b>
Día 13	100	76,1	100	67,4	73,3	100	100		<b>88,1</b>	100	81,7	100	100	100	100	72,3		<b>93,4</b>	100	100	100	100	100	100	100		<b>100</b>
Día 14	100	100	100	70,9	100	100	100		<b>95,8</b>	100	90,9	100	100	100	100	73,5		<b>94,9</b>	100	100	100	100	100	100	100		<b>100</b>

Anexo D. Evaluación Score Histológico hecho por histopatólogos veterinarios. (RE: Reepitelización, TG: Tejido de Granulación, CI: Células Inflamatorias, AN: Angiogénesis; P1: Patólogo 1, P2: Patólogo 2; SC: Score histológico)

PLACA	TTO / DÍA	RE			TG			CI			AN		
		P1	P2	SC	P1	P2	SC	P1	P2	SC	P1	P2	SC
4	C7	2	3	2,5	2	2	2	3	3	3	3	3	3
		2	3	2,5	2	2	2	3	3	3	3	3	3
		2	3	2,5	2	2	2	3	3	3	3	3	3
		2	3	2,5	2	2	2	3	3	3	3	3	3
		2	3	2,5	2	2	2	3	3	3	3	3	3
7	C14	3	2	2,5	2	2	2	3	4	3,5	3	3	3
		3	2	2,5	2	2	2	3	4	3,5	3	3	3
		3	2	2,5	2	2	2	3	4	3,5	3	3	3
		3	2	2,5	2	2	2	3	4	3,5	3	3	3
		3	2	2,5	2	2	2	3	4	3,5	3	3	3
2	AD-H7	2	3	2,5	2	2	2	2	0	1	4	4	4
		2	3	2,5	2	2	2	2	0	1	4	4	4
		2	3	2,5	2	2	2	2	0	1	4	4	4
		2	3	2,5	2	2	2	2	0	1	4	4	4
		2	3	2,5	2	2	2	2	0	1	4	4	4
8	AD-H14	3	4	3,5	3	3	3	4	4	4	4	3	3,5
		3	4	3,5	3	3	3	4	4	4	4	3	3,5
		3	4	3,5	3	3	3	4	4	4	4	3	3,5
		3	4	3,5	3	3	3	4	4	4	4	3	3,5
		3	4	3,5	3	3	3	4	4	4	4	3	3,5
3	MO-H7	4	4	4	2	3	2,5	4	3	3,5	4	3	3,5
		4	4	4	2	3	2,5	4	3	3,5	4	3	3,5
		4	4	4	2	3	2,5	4	3	3,5	4	3	3,5
		4	4	4	2	3	2,5	4	3	3,5	4	3	3,5
		4	4	4	2	3	2,5	4	3	3,5	4	3	3,5
9	MO-H14	3	4	3,5	3	3	3	4	4	4	4	4	4
		3	4	3,5	3	3	3	4	4	4	4	4	4
		3	4	3,5	3	3	3	4	4	4	4	4	4
		3	4	3,5	3	3	3	4	4	4	4	4	4
		3	4	3,5	3	3	3	4	4	4	4	4	4
1	AD-N7	2	3	2,5	1	1	1	1	0	0,5	3	4	3,5
		2	3	2,5	1	1	1	1	0	0,5	3	4	3,5
		2	3	2,5	1	1	1	1	0	0,5	3	4	3,5
		2	3	2,5	1	1	1	1	0	0,5	3	4	3,5
		2	3	2,5	1	1	1	1	0	0,5	3	4	3,5
10	AD-N14	3	3	3	3	2	2,5	3	3	3	3	3	3
		3	3	3	3	2	2,5	3	3	3	3	3	3
		3	3	3	3	2	2,5	3	3	3	3	3	3
		3	3	3	3	2	2,5	3	3	3	3	3	3
		3	3	3	3	2	2,5	3	3	3	3	3	3
5	MO-N7	2	4	3	1	2	1,5	3	3	3	3	4	3,5
		2	4	3	1	2	1,5	3	3	3	3	4	3,5
		2	4	3	1	2	1,5	3	3	3	3	4	3,5
		2	4	3	1	2	1,5	3	3	3	3	4	3,5
		2	4	3	1	2	1,5	3	3	3	3	4	3,5
6	MO-N14	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
		3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
		3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
		3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
		3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3

Anexo E. Vascularización de las heridas. Se presentan promedios generales.

VASCULARIZACIÓN						
DÍA 7°	HC	HAdh	HAdn	MOh	MOh	Piel Sana
DÍA 7°	47	54	50	60	50	28
	44	59	59	53	53	34
	43	58	49	68	47	27
	48	55	55	65	55	38
	50	57	59	52	59	23
	<b>46,4</b>	<b>56,6</b>	<b>54,4</b>	<b>59,6</b>	<b>52,8</b>	<b>30</b>
DÍA 7°	59	68		65		
	58	59		67		
	49	61		61		
	63	62		59		
	61	65		70		
	<b>58</b>	<b>63</b>		<b>64,4</b>		
DÍA 7°	54					
	55					
	48					
	55					
	49					
	<b>52,2</b>					
<b>DÍA 7°</b>	<b>52,2</b>	<b>59,8</b>	<b>54,4</b>	<b>59,6</b>	<b>52,8</b>	<b>30</b>
DÍA 14°	HC	HAdh	HAdn	MOh	MOh	Piel Sana
DÍA 14°	14	89	40	45	46	28
	17	75	32	58	39	34
	22	73	29	43	41	27
	21	80	34	56	43	38
	18	78	37	49	40	23
	<b>18,4</b>	<b>79</b>	<b>34,4</b>	<b>50,2</b>	<b>41,8</b>	<b>30</b>
DÍA 14°	59	57	48	49	35	
	40	51	31	56	28	
	48	58	29	58	31	
	39	49	39	46	35	
	44	55	32	48	29	
	<b>46</b>	<b>54</b>	<b>35,8</b>	<b>51,4</b>	<b>31,6</b>	
DÍA 14°	58	70		56		
	48	65		49		
	47	55		51		
	51	52		47		
	49	58		52		
	<b>50,6</b>	<b>60</b>		<b>51</b>		
DÍA 14°	23	36		48		
	27	40		52		
	22	39		56		
	28	45		49		
	19	48		59		
	<b>23,8</b>	<b>41,6</b>		<b>52,8</b>		
DÍA 14°	28					
	23					
	25					
	22					
	27					
	<b>25</b>					
<b>DÍA 14°</b>	<b>32,76</b>	<b>58,65</b>	<b>35,1</b>	<b>51,35</b>	<b>36,7</b>	<b>30</b>